

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**Avaliação da Potencial Atividade Antimicrobiana de Produtos de  
Origem Natural: Estudo Bioguiado de *Dalbergia ecastaphyllum* L.  
Taub.**

**Cassandra Aresi**

**Florianópolis**  
**2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**Avaliação da Potencial Atividade Antimicrobiana de Produtos de  
Origem Natural: Estudo Bioguiado de *Dalbergia ecastaphyllum* L.  
Taub.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Flávio H. Reginatto

**FLORIANÓPOLIS**  
**2011**



## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho aos meus pais e  
ao meu noivo Geison*

*“Há um tempo em que é preciso abandonar as  
roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo e  
esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre  
aos mesmos lugares. É o tempo da travessia, e, se  
não ousarmos fazê-la, teremos ficado para sempre à  
margem de nós mesmos.”*

*Fernando Pessoa*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Flávio H. Reginatto por aceitar me orientar, pela oportunidade de realizar este trabalho e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Eloir P. Schenkel pelas sugestões e pelo auxílio na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Segatto e a Prof. Dr<sup>a</sup> Simone Gonçalves Cardoso por permitirem a realização dos ensaios microbiológicos no Laboratório de Controle de Qualidade.

Ao Prof. Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg, pela identificação do material vegetal.

As técnicas dos Laboratórios de Farmacognosia, Química Farmacêutica e Controle de Qualidade, Claudinha e Solange, por todas as vezes que precisei de ajuda e sempre fui amparada.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade, pela amizade e acolhimento.

Aos amigos e colegas de Laboratório Maria Izabel, Karen, Vanessa, Simone, Claiton, Carol, Lara, Carize, Maluá, Priscila, Teca, Solomon, Dani, Andréia, Andressa, Mari, Naira, pelas sugestões na realização do trabalho, por todo o carinho e pela convivência que tornaram este período muito mais agradável.

À minha grande ajudante Fran, que me auxiliou na reta final do trabalho

À Taty pela amizade, pelo auxílio e pela parceria nos momentos difíceis da padronização da bioautografia.

Às minhas queridas amigas Pati e Débora, por sempre me apoiarem.

Aos “blodinhos” Carlos, Samy, Fer e Virgínia pela convivência, pelo companheirismo, por me ouvirem quando eu precisei, pelos momentos de alegria e amizade.

Aos meus pais, pela compreensão, pelo amor e apoio constante.

Ao meu noivo Geison, por acreditar mais em mim do que eu mesma, por todo apoio, ajuda, paciência, amor e carinho que tem comigo.





## RESUMO

A pesquisa de novas substâncias com potencial antimicrobiano possui grande relevância científica, pois o aumento das infecções fúngicas oportunistas e o uso indiscriminado dos antimicrobianos tradicionais na prática clínica resultou no aparecimento de diversos patógenos resistentes. A utilização tradicional de produtos naturais, aliada ao desenvolvimento científico, tem propiciado grandes avanços no estudo de plantas medicinais. A diversidade estrutural dos seus fitoconstituintes lhes confere um grande potencial terapêutico como fonte de matéria-prima farmacêutica para a obtenção de novos agentes antimicrobianos ou como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a potencial atividade antimicrobiana de produtos de origem natural e realizar um estudo bio guiado com a espécie vegetal que apresentar os melhores resultados. Foram avaliados 22 extratos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 10231), pelo método de difusão em disco na concentração de 100 mg/mL, sendo o extrato etanólico das folhas de *Dalbergia ecastaphyllum* o único que apresentou halo de inibição frente a *S. aureus* e *E. faecalis* igual ou superior a 10 mm. O extrato etanólico foi particionado com solventes de polaridade crescente e, através dos ensaios de difusão em disco e macrodiluição, foi possível observar que a fração acetato de etila (AcOEt) apresentou potente atividade frente à *S. aureus* com halos de inibição de 14 mm e concentração bactericida mínima (CBM) de 6,25 mg/mL. A análise por cromatografia em camada delgada (CCD) aliada ao ensaio bioautográfico, demonstrou que a fração AcOEt concentrava a maioria dos constituintes bioativos e que o comportamento cromatográfico desta fração sugere a presença de flavonóides e taninos condensados, visto que esta fração apresentou zona de inibição na região de R<sub>f</sub> correspondente aos flavonóides e taninos detectados na análise por CCD. Na análise do teor de compostos fenólicos a fração AcOEt apresentou o maior teor de fenólicos totais ( $11,05 \pm 0,128$  EAG em g/100 g de extrato seco). Este é o primeiro relato da atividade antibacteriana de *Dalbergia ecastaphyllum*, sendo os compostos fenólicos presentes na fração AcOEt da classe dos flavonóides e taninos, os responsáveis pela atividade com potencial antibacteriano promissor, considerando a CBM detectada.

Unitermos: Triagem antimicrobiana, *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub., difusão em disco, CBM, bioautografia.

## ABSTRACT

### SCREENING OF POTENTIAL ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NATURAL PRODUCTS: BIOASSAY-GUIDED INVESTIGATION OF *Dalbergia ecastaphyllum* L. TAUB.

The search for new substances with antimicrobial potential has high scientific relevance, once the increase in opportunistic fungal infections and the indiscriminate use of traditional antimicrobials resulted in the multiple-drug-resistant organisms. The traditional use of natural products coupled with the scientific development led great advances in the study of medicinal plants. The structural diversity of its constituents provided a great therapeutic potential as a source pharmaceutical raw material or as models for new drugs. This study aimed to evaluate the potential antimicrobial activity of natural products and a biofractionation-guided investigation with the plant species that provide the best results. Twenty-two extracts were evaluated against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Candida albicans* (ATCC 10231) by the disk diffusion method at 100 mg/mL and only the ethanolic extract from the leaves of *Dalbergia ecastaphyllum* showed inhibition zone against *S. aureus* and *E. faecalis*  $\geq 10$  mm. Thus, the ethanolic extract was partitioned with solvents of increasing polarity and by the disk diffusion and macrodilution assays it was observed that the ethyl acetate fraction (AcOEt) showed higher activity against *S. aureus* with inhibition zones of 14 mm and minimum bactericidal concentration (MBC) of 6,25 mg/mL. Thin-layer chromatography (TLC) analyses together the bioautography assay showed that the AcOEt fraction has the most bioactive constituents and the chromatographic fingerprint of this fraction suggests the presence of flavonoids and condensed tannins, since the inhibition zone detected is in  $R_f$  values corresponding to flavonoids and tannins detected in the TLC analyses. Finally, the the highest total phenolic content ( $11,05 \pm 0,128$  GAE g/100 g of dry extract) were detected in the AcOEt fraction. This is the first report of antibacterial activity of *Dalbergia ecastaphyllum* and the phenolic compounds present in the AcOEt fraction - flavonoids and tannins - are responsible for the promising antibacterial activity, considering the MBC detected.

Key words: Antimicrobial Screening, *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub., disk diffusion method, MBC, bioautography.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Flavonóides de <i>Dodonaea viscosa</i> Jacq. var. angustifolia.....	27
Figura 2: Isoflavonóides de <i>Dalbergia horrida</i> Dennst.....	31
Figura 3: Isoflavonóides de <i>Dalbergia olivieri</i> Gamble.....	32
Figura 4: <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> .....	34
Figura 5: Principais constituintes químicos relatados para <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> .....	36
Figura 6: Halo de inibição fração acetato de etila do extrato etanólico de <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> .....	53
Figura 7: Teor de fenólicos totais do extrato etanólico e frações de <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> .....	55
Figura 8: Coeficiente de Correlação de Spearman entre o conteúdo de fenólicos totais (EAG g/100g extrato seco) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em mg/mL frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .....	56
Figura 9 A: CCD do extrato bruto e frações de <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> , agente de detecção cloreto férrico.....	57
Figura 9 B: CCD do extrato bruto e frações de <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> , agente de detecção vanilina sulfúrica.....	57
Figura 9 C: CCD do extrato bruto e frações de <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> , agente de detecção reagente natural visualização UV 366 nm.....	57
Figura 10: Bioautografia da fração acetato de etila frente a <i>Staphylococcus aureus</i> após revelação com Cloreto de Trifeniltetrazólio 0,5%.....	58

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Espécies vegetais avaliadas na triagem antimicrobiana.....	28
Quadro 2: Principais atividades biológicas/farmacológicas de algumas espécies de <i>Dalbergia</i> .....	33
Quadro 3: Espécies vegetais selecionadas para a triagem antimicrobiana e informações sobre a preparação dos extratos.....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Halos de inibição da triagem antibacteriana e antifúngica pelo método de difusão em disco.....	49
Tabela 2: Halos de inibição das frações do extrato etanólico de <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> pelo método de difusão em disco.....	52
Tabela 3: Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato bruto e frações de <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> .....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt: Acetato de etila  
ATCC: American Type Culture Collection  
BHI: Infusão de Cérebro e Coração  
BuOH: *n*-butanol  
CBM: Concentração Bactericida Mínima  
CCD: Cromatografia em camada delgada  
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: Diclorometano  
CIM: Concentração inibitória mínima  
CIP: Collection Institut Pasteur  
CLSI: Clinical Laboratory Standard Institute  
DCM: Diclorometano  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
EAG: Equivalentes de ácido gálico  
EtOH: Etanol  
FDA: Food and Drug Administration  
HEX: Hexano  
HTS: High-throughput screening  
IMI: International Mycological Institute  
MTCC: Microbial Type Culture Collection  
NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards  
NCIB: National Collection of Industrial Bacteria  
NCTC: National Collection of Type Cultures  
Rf: Fator de retenção  
RSKK: Refik Saydam National Type Culture Collection  
SBAC: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas  
TTC: Cloreto de Trifeniltetrazólio  
UFC: Unidades formadoras de colônia  
UV: Ultravioleta  
WHO: World Health Organization



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>24</b>
3.1 Atividade antimicrobiana de produtos de origem vegetal.....	24
3.2 Gênero <i>Dalbergia</i> .....	29
3.2.1 <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> L. Taub. (Fabaceae).....	34
3.3 Métodos para detecção de compostos com atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> .....	36
3.3.1 Método por difusão.....	37
3.3.2 Método por diluição.....	38
3.3.3 Bioautografia.....	39
3.3.3.1 Bioautografia de contato ou difusão no ágar.....	40
3.3.3.2 Imersão ou método da sobreposição do ágar.....	40
3.3.3.3 Bioautografia direta.....	41
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
4.1 Material Vegetal.....	42
4.2 Preparação dos extratos.....	42
4.3 Ensaio Antimicrobianos.....	45
4.3.1 Método de difusão em disco.....	45
4.3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	46
4.3.3 Bioautografia.....	46
4.4 Caracterização química do extrato de <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> .....	46
4.4.1 Teor de fenólicos totais.....	46
4.4.2 Cromatografia em camada delgada.....	47
4.5 Análise estatística.....	47
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>61</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>



## 1. INTRODUÇÃO

As substâncias antimicrobianas representam um dos principais avanços terapêuticos nas últimas décadas. Contudo, apesar da enorme gama de fármacos antibacterianos e antifúngicos disponíveis, e da sua evolução química e farmacológica, o uso indiscriminado destes medicamentos resultou no aparecimento de patógenos resistentes (LIVERMORE, 2005; MARZOUK et al., 2009; WHO, 2002).

Atualmente, a resistência bacteriana aos antibióticos tem causado prejuízos na clínica sendo considerada causa primária de morte nas unidades de cuidados intensivos nos hospitais em todo mundo (ALEKSHUN; LEVY, 2007; LIVERMORE, 2005). Em 2004, estimou-se que mais de 70% das bactérias patogênicas apresentavam resistência a pelo menos um antibiótico disponível para uso clínico (KATZ et al., 2006).

Desta maneira, a necessidade permanente do desenvolvimento de novos fármacos a serem utilizados no combate e/ou controle dos microrganismos permanece significativa no contexto científico mundial (AYRES et al., 2008; COWAN, 1999; CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997; PACKER; LUZ, 2007; RATES, 2001) sendo, os produtos naturais, potenciais fontes de novos agentes antibacterianos e antifúngicos (MARZOUK et al., 2009).

Os produtos naturais originados a partir de microorganismos, animais e principalmente plantas medicinais, têm sido empregados na cura de doenças por milhares de anos (CHATTOPADHYAY; KHAN, 2008; CHIN et al., 2006; HARVEY, 2000). A utilização tradicional de espécies vegetais aliada ao desenvolvimento científico tem propiciado grandes avanços no estudo terapêutico de plantas medicinais e, em consequência, na descoberta de novas substâncias com promissoras atividades biológicas e farmacológicas, sendo usados como fármacos, matéria-prima para a síntese de moléculas complexas ou como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos (NEWMAN, 2008; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; OJIMA, 2008; PIETERS; VLIETINCK, 2005; WANG, 2008). Para o tratamento das doenças infecciosas, por exemplo, de um total de 230 fármacos aprovados pelo FDA, entre os anos de 1950 e 2006, 137 foram obtidos de fontes naturais ou baseados nestes produtos (NEWMAN; CRAGG, 2007). Assim, a variedade dos metabólitos secundários encontrados na natureza representa uma ferramenta essencial na descoberta e

desenvolvimento de novos produtos bioativos, em função da sua diversidade química estrutural (NICOLAOU; CHEN; DALBY, 2009).

Vários metabólitos secundários de plantas são investigados em relação as suas propriedades antimicrobianas (COWAN, 1999; MAHADY, 2005), pois estas substâncias têm exercido um importante papel no controle de doenças causadas por bactérias e fungos (DEMAIN; SANCHEZ, 2009). Dentre estes, destacam-se os flavonóides (BYLKA; MATLAWSKA; PILEWSKI, 2004), taninos (SCALBERT, 1991; SOUZA et al., 2007), alcalóides (O'DONNELL; GIBBONS, 2007), saponinas (BAHRAMINEJAD et al., 2008) e terpenóides (SHAI et al., 2008), metabólitos secundários largamente investigados e que possuem potencial atividade antimicrobiana, o que os torna potencial fonte de matéria-prima farmacêutica para a obtenção de novos agentes antimicrobianos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a potencial atividade antimicrobiana de extratos vegetais, realizar um estudo bioguiado com a espécie vegetal que apresentar os resultados mais promissores e correlacionar estes dados com a composição química da espécie.

### 2.2 Objetivos específicos

Realizar uma triagem antibacteriana e antifúngica de extratos e frações de diferentes espécies vegetais da biodiversidade brasileira, frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 10231), através da técnica de difusão em disco.

Identificar, através da técnica de macrodiluição em caldo, a concentração inibitória mínima dos extratos e frações de *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub.

Determinar a concentração bactericida mínima dos extratos e frações de *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub. que apresentaram resultado no ensaio de difusão em disco.

Realizar a caracterização química dos extratos e frações de *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub. através do teor fenólicos totais e por cromatografia em camada delgada.

Selecionar a fração que apresentou o melhor resultado no ensaio de difusão em disco e macrodiluição, e detectar os compostos responsáveis pela atividade através da técnica de bioautografia.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Atividade antimicrobiana de produtos de origem vegetal

A ocorrência de substâncias com potencial antimicrobiano em produtos naturais não é um fato recente, pois a busca pelas mesmas teve grande impulso após a descoberta da penicilina a partir do fungo filamentosso *Penicillium notatum*, por Alexander Fleming, em 1929, seguido de muitos outros estudos que induziram a descoberta de novas substâncias com atividade antimicrobiana, tais como a eritromicina, nistatina, vancomicina, artemisinina, frente a diversos microorganismos, como bactérias, fungos e parasitas (CRAGG; NEWMANN, 2007; LIMA, 2001).

A introdução dos antibióticos da classe das sulfonamidas na década de 1930 e da penicilina na década de 1940 revolucionou a prática médica, diminuindo significativamente as taxas de mortalidade associada às infecções bacterianas. Estas descobertas concentraram esforços na busca por novos fármacos antibacterianos durante os 30 anos seguintes, resultando na descoberta da maioria das classes de antibacterianos conhecidos atualmente, muitos deles derivados de produtos naturais (BUTLER; BUSS, 2006).

Durante a última década, observou-se o desenvolvimento de patógenos resistentes e os antibióticos tiveram sua eficácia reduzida, este problema vem se agravando pelo fato de que novos fármacos raramente chegam ao mercado (SALEEM et al., 2010). A resistência a um determinado fármaco, sobretudo aos antimicrobianos, está associada à sua má utilização, pois mais de 60% destes medicamentos são prescritos de forma não racional (MIMICA MATANOVIC et al., 2010).

Desde 1970 constatou-se que somente três novas classes de antibacterianos chegaram ao mercado e, nos últimos 20 anos houve um declínio de 56% no número de antibióticos aprovados pelo FDA (BUTLER; BUSS, 2006). É importante ressaltar que muitos dos antibióticos descobertos até o início dos anos 1970 e que atingiram o mercado farmacêutico apresentavam características químicas que foram usadas posteriormente como protótipos para geração de novos antibióticos (PELÁEZ, 2006).

Neste contexto, novas estratégias vêm sendo desenvolvidas na pesquisa de produtos naturais com a finalidade de acelerar o processo na descoberta de novos antimicrobianos, como: a descoberta de substâncias

em microorganismos pouco explorados (organismos obtidos de novos ecossistemas, como bactérias de solo e organismos marinhos), a utilização de ferramentas genômicas para o acesso a novos produtos naturais e a busca por fármacos com novos mecanismos de ação antimicrobiana, o que, aliado a novos ensaios biológicos, permitem triagens *in vivo* e *in vitro* de um grande número de amostras (High-throughput screening, HTS) (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

A medicina tradicional dos países em desenvolvimento (América do Sul, África, Ásia e Índia) contém uma imensa reserva de espécies que ainda não foram completamente avaliadas, tanto do ponto de vista químico como farmacológico (WAGNER, 2007). O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo, possuindo em sua flora um número superior a 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total mundial. Esta rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação do uso de plantas medicinais em virtude do conhecimento tradicional (CARVALHO et al., 2007; SILVA; FERNANDES JÚNIOR, 2010).

Neste contexto, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas na busca de novos fitoconstituintes com alto valor terapêutico que possam servir como fontes valiosas para a potencial produção de novos medicamentos úteis em diversas doenças (ABEYSINGHE, 2010; BETONI et al., 2006, LEE, 2010; PERUMAL SAMY; GOPALAKRISHNAONE, 2010).

As micromoléculas ou metabólitos secundários desenvolvem um papel de significativa importância nas espécies vegetais, pois além de serem responsáveis pelo aroma, odor e pigmentos das plantas, servem como mecanismos de defesa contra microorganismos (vírus e outros agentes infecciosos), insetos e herbívoros. Ao contrário dos metabólitos primários, eles possuem distribuição restrita, ou seja, são encontrados em concentrações relativamente baixas em plantas e microorganismos, apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular e são caracterizados por uma enorme diversidade química e marcantes atividades biológicas (ITOKAWA et al., 2008; PERUMAL SAMY; GOPALAKRISHNAONE, 2010; VERPOORTE, 2000).

De acordo com Cowan (1999) e Silva; Fernandes Junior (2010) os compostos fenólicos são o grupo de metabólitos secundários que apresentam maior número de substâncias com atividade antimicrobiana. Compostos fenólicos encontram-se amplamente distribuídos nas

espécies vegetais, com a função de proteção contra infecções microbianas, radiação UV e estresse químico. Atualmente, plantas que contém altos teores de compostos fenólicos são alvos de interesse, devido a potencial propriedade antioxidante destas substâncias e por atuarem como poderosos agentes anti-infecciosos (SALEEM et al., 2010).

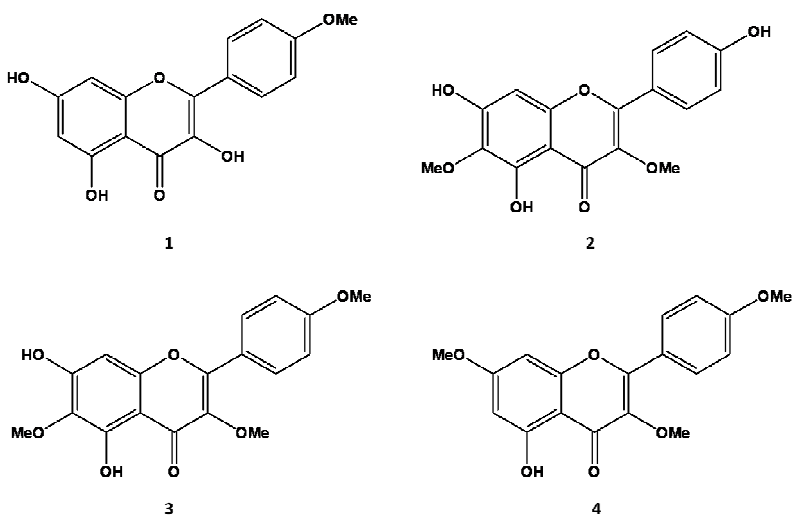
Os compostos fenólicos são extremamente diversos, sendo conhecidos mais de oito mil estruturas que incluem desde moléculas simples até outras altamente polimerizadas. A estrutura básica destes compostos é formada pelo anel benzênico com grupos hidroxilas associados diretamente à estrutura cíclica. Geralmente, os compostos fenólicos apresentam-se conjugados com mono e polissacarídeos ligados a um ou mais grupos fenólicos. Esta ampla categoria de compostos pode ser classificada como polifenóis ou fenóis simples, tendo como base o número de subunidades fenólicas presentes em sua estrutura (HARBONE; BAXTER; MOSS, 1999). Na literatura, diversas espécies vegetais que possuem atividade antimicrobiana são ricas em polifenóis como flavonóides, quinonas, taninos, catequinas e ácidos fenólicos. (PERUMAL SAMY; GOPALAKRISHNAONE, 2010; SALEEM et al., 2010).

Coulidiati e colaboradores (2011) avaliaram a composição química e as atividades antioxidante e antibacteriana dos extratos acetona e frações das folhas de *Combretum acutum* Laws e das partes aéreas de *Combretum sericeum* G. Don. A avaliação da atividade antibacteriana frente a cinco cepas bacterianas padrão ATCC e a cinco bactérias obtidas por isolados clínicos foi realizada por meio do método de difusão. Segundo os autores, a fração *n*-butanol de ambas as espécies foram as que exibiram melhor atividade antioxidante e antibacteriana, atividades relacionadas aos altos teores de taninos em sua composição química.

A atividade antimicrobiana dos extratos hexano, acetato de etila e metanol das raízes de *Bauhinia tomentosa* e *Bauhinia vahlii* foram avaliados frente a quatro cepas de bactérias gram positivas, quatro gram negativas e três fungos através do método de microdiluição. Os resultados mais significativos foram obtidos com os extratos acetato de etila e metanol para ambas as espécies, e relacionados à presença de compostos fenólicos da classe dos flavonóides e taninos, respectivamente (DUGASANI et al., 2010).



Quatro flavonóides (Figura 1) isolados das folhas de *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* e identificados como 3,5,7-triidroxi-4-metoxiflavona, 5,7,4-triidroxi-3,6-dimetoxiflavona, 5,7-diidroxi-3,6,4-trimetoxiflavona e 5-hidroxi-3,7,4-trimetoxiflavona, foram investigados. A atividade frente a *S. aureus* (ATCC 29213), *E. faecalis* (ATCC 29212), *P. aeruginosa* (ATCC 25922) e *E. coli* (ATCC 27853) foi realizada através da técnica de microdiluição e os valores de concentração inibitória mínima variaram em uma faixa de 16 µg/mL a 250 µg/mL (TEFFO; ADEROGBA; ELOFF, 2010).



**Figura 1:** Flavonóides de *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* (1) 3,5,7-triidroxi-4-metoxiflavona; (2) 5,7,4-triidroxi-3,6-dimetoxiflavona; (3) 5,7-diidroxi-3,6,4-trimetoxiflavona; (4) 5-hidroxi-3,7,4-trimetoxiflavona.

A própolis, usada na medicina desde 300 a.C. tem se destacado em inúmeras pesquisas por suas propriedades biológicas, entre elas a atividade antimicrobiana. Estudos realizados por Castro e colaboradores (2007) e Choi e colaboradores (2006) avaliaram a atividade antibacteriana de diferentes tipos de própolis. Ambos verificaram que os melhores resultados de atividade antibacteriana estiveram associados a maiores concentrações de flavonóides nos própolis avaliados, o que sugere uma estreita relação da atividade antibacteriana com o teor de flavonóides totais.

Através de análises fitoquímicas previamente realizadas em nosso grupo de pesquisa (COELHO et al., 2010; COSTA et al., 2010; FAGUNDES et al., 2008; LANG et al., 2006; ZUCOLOTTO et al., 2009), constatou-se uma variedade de espécies vegetais que contém compostos fenólicos em sua composição química, assim como algumas destas possuem relato de usos populares em patologias de origem bacterianas, tornando-se interessante verificar a possível atividade antimicrobiana destas espécies.

Dessa forma, foi realizada uma triagem da atividade antimicrobiana de diversas espécies vegetais (Quadro 1) empregando a técnica de difusão em disco. Em função dos resultados obtidos após esta triagem (item 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO) a espécie selecionada como objeto de estudo desta dissertação foi *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub., e portanto, a revisão da literatura descrita a seguir está centrada nesta espécie vegetal.

**Quadro 1:** Espécies vegetais avaliadas na triagem antimicrobiana

Nome Botânico	Nome popular	Família
<i>Cecropia pachystachia</i>	Embaúba	Urticaceae
<i>Dalbergia ecastaphyllum</i> L. Taub.	Rabo-de-bugio	Fabaceae
<i>Dodonaea viscosa</i> Jacq	Vassoura-vermelha	Sapindaceae
<i>Garcinia gardneriana</i>	Bacupari	Clusiaceae
<i>Ilex paraguariensis</i>	Erva-mate	Aquifoliaceae
<i>Musa x paradisiaca</i> L.	Bananeira	Musaceae
<i>Passiflora alata</i>	Maracujá doce	Passifloraceae
<i>Passiflora edulis</i> Sims var. <i>edulis</i>	Gulupa	Passifloraceae
<i>Passiflora manicata</i> Juss.	Diablito	Passifloraceae
<i>Passiflora quadrangularis</i> Linneaus	Badea	Passifloraceae
<i>Passiflora tripartita</i> var. <i>mollissima</i> Holm-Nielsen & Møller Jørgensen	Curuba	Passifloraceae
<i>Wilbrandia ebracteata</i>	Taiuiá	Cucurbitaceae

### 3.2 Gênero *Dalbergia*

O gênero *Dalbergia* pertence à família Fabaceae, embora também existam correntes que a classifiquem como subfamília Papilionoideae (Faboideae) da família Leguminosae (DI STASI et al., 2002). Estas espécies caracterizam-se como árvores, arbustos e trepadeiras lenhosas amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais. O gênero consiste de 300 espécies sendo aproximadamente 39 destas de ocorrência no Brasil (CARVALHO, 1997; VASUDEVA et al., 2009).

Muitas espécies do gênero *Dalbergia* possuem sua madeira valorizada por ser decorativa e perfumada, rica muitas vezes em óleos essenciais. Possuem ampla aplicação tradicional, sendo utilizada na medicina popular como analgésica, antiinflamatória, antimicrobiana, antidiarreica, antihelmíntica, antiulcerogênica entre outras (VASUDEVA et al., 2009).

Apesar da grande variedade de espécies conhecidas e da sua ampla aplicação na medicina popular, um número significativo de espécies do gênero *Dalbergia* vêm sendo estudadas quanto à avaliação de suas atividades antibacteriana e antifúngica. Destas, destacam-se *Dalbergia paniculata*, *D. parviflora*, *D. melanoxydon*, *D. pseudo-sissoo*, *D. sissoo*, *D. horrida*, *D. saxatilis*, *D. oliveri* e *D. subcymosa*.

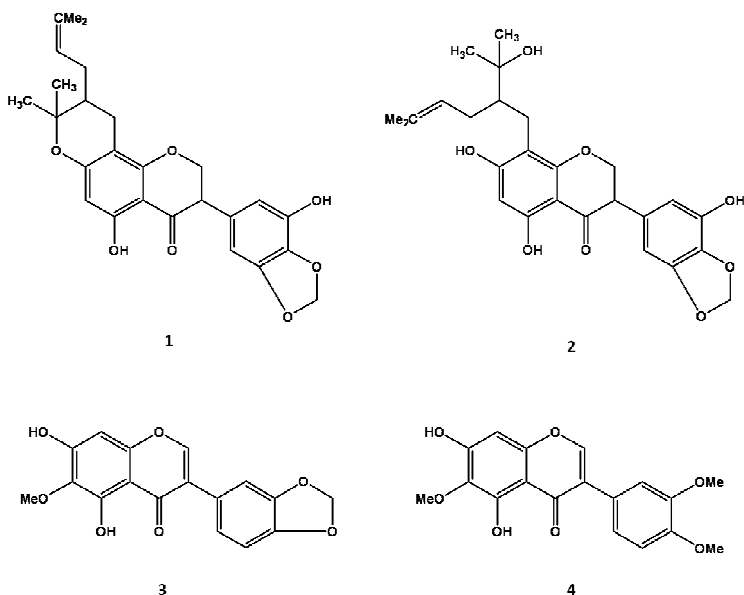
O óleo da semente de *D. paniculata* foi avaliado frente às bactérias *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e frente aos fungos *Curvularia lunata*, *Helminthosporium oryzae* e *Fusarium solani* e nenhuma atividade foi verificada (RAMACHANDRAIAH, 1991).

Gundidza; Gaza (1993) avaliaram a atividade antimicrobiana das cascas de *D. melanoxydon* contra sete bactérias [quatro gram-negativas: *E. coli* (NCIB 8879), *P. aeruginosa* (NCIB 950), *Salmonella typhimurium* (NCTC 1074) e *Yersinia pestis* (NCTC 10460), e três gram-positivas: *Bacillus subtilis* (NCIB 3610), *Klebsiella pneumoniae* (NCIB 418) e *S. aureus* (NCIB 6571)] utilizando o método de difusão em poço, e também frente a dois fungos [*C. albicans* (IMI 15954) e *Aspergillus niger* (IMI 17454)] pelo método de crescimento micelial. O extrato ácido cítrico apresentou melhor atividade antimicrobiana inibindo todas as bactérias e fungos testados. O extrato etanólico apresentou somente atividade antibacteriana e o extrato diclorometano não apresentou atividade antibacteriana, mas mostrou significativa atividade antifúngica.

Em uma triagem com 191 extratos de plantas da Malásia foi avaliada a atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco, do extrato metanólico das folhas e cascas de *D. parviflora* e *D. pseudo-sissoo* frente à *S. aureus* (ATCC 25923), *E. faecalis* (ATCC 29212), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *C. albicans* (ATCC 90028). Ambos os extratos apresentaram atividade somente contra *S. aureus*, sendo que o extrato das folhas de *D. pseudo-sissoo* e os extratos da casca e folhas de *D. parviflora* apresentaram fraca atividade (halos inferiores a 9,5 mm), enquanto o extrato da casca de *D. pseudo-sissoo* demonstrou moderada atividade antibacteriana (10 - 14,9 mm) (CHUNG et al., 2004).

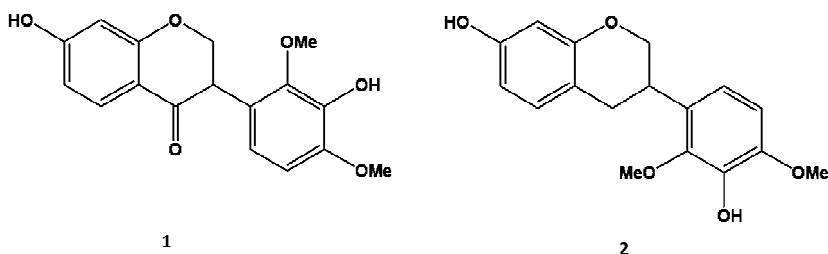
Brijesh e colaboradores (2006) avaliaram a atividade do extrato aquoso das folhas secas de *D. sissoo* preparado por decocção, frente a bactérias capazes de causar infecções diarréicas (*E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri* e *Campylobacter jejuni*, todas obtidas de isolados clínicos). Os autores verificaram que o extrato não apresentou atividade antibacteriana, embora atividade antidiarreica tenha sido detectada, pois o extrato atuou na virulência de bactérias reduzindo a produção de enterotoxinas, a aderência e, por consequência, a invasão bacteriana.

O extrato enriquecido com quatro isoflavonóides (Figura 2) das raízes de *D. horrida* Dennst, foi avaliado através do método de difusão em disco frente a *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* obtidos de isolados clínicos. O extrato apresentou fraca atividade frente a *B. subtilis* e nenhuma atividade frente às outras cepas testadas (NARAYANAN et al., 2007).



**Figura 2:** Isoflavonóides de *Dalbergia horrida* Dennst. (1) Dalhorridina; (2) Dalhorridinina; (3) Dalspinina e (4) Dalspinosina.

A atividade antimicrobiana de violanona e mucronulatol (Figura 3), isoflavonóides isolados de *D. oliveri* Gamble, foram avaliados frente à bactérias e fungos. As duas substâncias não apresentaram atividade frente às bactérias *S. aureus* (CIP 53154), *E. coli* (CIP 54127) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 28383), entretanto, ambos compostos inibiram os fungos fitopatogênicos *Alternaria brassicicola* e *Fusarium oxysporum*, sendo que este último apresentou significativa inibição do crescimento visualizado através da técnica de bioautografia direta (DEESAMER et al., 2007).



**Figura 3:** Isoflavonóides de *Dalbergia olivieri* Gamble (1) Violanona e (2) Mucronulatol.

A avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico de *D. subcymosa* frente a bactérias padrão ATCC [*Proteus mirabilis* (ATCC 7022), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 27858), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 29213), *E. faecalis* (ATCC 29212) e *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 46619)], e a cepas multirresistentes obtidas de isolados clínicos, foi verificada, através do método de difusão em disco, por Correia e colaboradores (2008), em uma triagem com 10 extratos de diferentes espécies coletadas na região da Amazônia. Os autores verificaram que o extrato das cascas de *D. subcymosa* apresentou atividade apenas frente à cepa multirresistente *S. aureus*, na concentração de 20 µg.

O extrato etanólico das folhas e cascas de *D. saxatilis* foi investigado frente a cinco microorganismos patogênicos padrão ATCC (*S. aureus* ATCC 13709, *E. coli* ATCC 9637, *C. albicans* ATCC 10231, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 10031) e a um isolado clínico (*Bacillus subtilis*). O extrato das folhas apresentou atividade somente frente a *S. aureus*, na concentração inibitória mínima (CIM) de 1000 µg/mL, enquanto o extrato da casca apresentou amplo espectro antimicrobiano com CIM de 1000 µg/mL frente às bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa*, e CIM de 250 µg/mL e 125 µg/mL para *S. aureus* e *B. subtilis*, respectivamente (OKWUTE et al., 2009).

Além das atividades antibacterianas e antifúngicas citadas anteriormente, espécies do gênero *Dalbergia* apresentam também outras atividades farmacológicas ou biológicas. O Quadro 2 sumariza as principais atividades descritas para algumas destas espécies.

**Quadro 2:** Principais atividades biológicas/farmacológicas descritas para o gênero *Dalbergia*

Atividade biológica ou farmacológica	Espécie	Referência
Analgésica	<i>D. sisso</i>	HAJARE et al., 2000
	<i>D. lanceolaria</i>	MISAR et al., 2005
	<i>D. horrida</i>	NARAYANAN et al., 2007
Antiinflamatória	<i>D. sissoo</i>	HAJARE et al., 2000
	<i>D. sissooides</i>	KAVIMANI et al., 1997; KAVIMANI; VETRICHILVAN; NAGARANJAN, 2002
	<i>D. lanceolaria</i>	KALE et al., 2007
	<i>D. volubilis</i>	HYE; GAFUR, 1975
	<i>D. horrida</i>	NARAYANAN et al., 2007
	<i>D. odorifera</i>	LEE et al., 2009
Antidiarreica	<i>D. sissoo</i>	BRIJESH et al., 2006
	<i>D. lanceolaria</i>	MUJUMDAR; MISAR; UPADHYE, 2005
Antiulcerogênica	<i>D. monetaria</i>	COTA et al., 1999 SOUZA BRITO; COTA; NUNES, 1997
Antipirética	<i>D. sissoo</i>	HAJARE et al., 2000
Larvicida e repelente de mosquito	<i>D. sissoo</i>	ANSARI et al., 2000
Antitumoral	<i>D. cultrate</i>	ITO et al., 2003
	<i>D. nigrescens</i>	ITO et al., 2003
Antiartrite	<i>D. volubilis</i>	HYE; GAFUR, 1975
Antiplaquetária	<i>D. odorifera</i>	TAO; WANG, 2010
Antigiardia	<i>D. frutescens</i>	KHAN et al., 2000
Antileishmania	<i>D. cultrate</i>	TAKAHASHI et al., 2004
Antiplasmodium	<i>D. louvelli</i>	BELDJOUDI et al., 2003;
	<i>D. parviflora</i>	SONGSIANG et al., 2009
Atividade espasmogênica na musculatura uterina (antifertilidade)	<i>D. saxatilis</i>	UCHENDU, 1999 UCHENDU; KAMALU; ASUZU, 2000
Depressor do SNC	<i>D. horrida</i>	NARAYANAN et al., 2007

Até o momento não há relatos da avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de *Dalbergia ecastaphyllum* o que constitui o objetivo principal deste trabalho.

### 3.2.1 *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub. (Fabaceae)

*Dalbergia ecastaphyllum* (Figura 4) é uma espécie que se distribui ao longo da costa do Continente americano, desde o sul da Flórida (EUA) ao sul do Brasil, assim como na costa ocidental da África, embora neste continente se distribua apenas em áreas próximas ao mar. É uma espécie de crescimento escandente ou semi-prostrada, encontrada associada a estuários. Sua ocorrência é quase sempre associada a leitos de rios e manguezais onde é dominante, reunindo um emaranhado de ramos e caules que auxiliam na fixação da areia. Pode ocorrer também em vegetação da costa seca e solos arenosos como um arbusto ou arvoreta, embora este fato não seja comum (CARVALHO, 1997; SILVA; SANTOS, 2009; SOUZA, 2010).



**Figura 4:** *Dalbergia ecastaphyllum*

Fonte: <http://www.tropicos.org>

*D. ecastaphyllum* é bem adaptada a condições de alta salinidade e seus frutos são capazes de flutuar devido a sua forma alada. A espécie freqüentemente cresce em locais em que há constante vaporização de sal e em solos moderadamente salinos, onde indivíduos mais velhos tendem a formar densas moitas. No início, seu crescimento é moderado e constante, embora espécies mais velhas possam crescer até dois metros por ano (SOUZA, 2010).



*Hedysarum ecastaphyllum* L., *Pterocarpus ecastaphyllum* L., *Ecastaphyllum ecastaphyllum* (L.) Britton, *Amerimnon ecastaphyllum* (L.) Standl são algumas sinônimas encontradas para *Dalbergia ecastaphyllum* (FRANCIS, 2004). Segundo alguns pesquisadores existem, inclusive, duas correntes distintas em relação à grafia de *Dalbergia ecastaphyllum*, visto que encontram-se na literatura informações sobre *Dalbergia ecastaphyllum* e *Dalbergia ecastophyllum*. As duas formas de grafia representam a mesma espécie, embora a maneira correta de referenciar seja *Dalbergia ecastaphyllum*<sup>1</sup>.

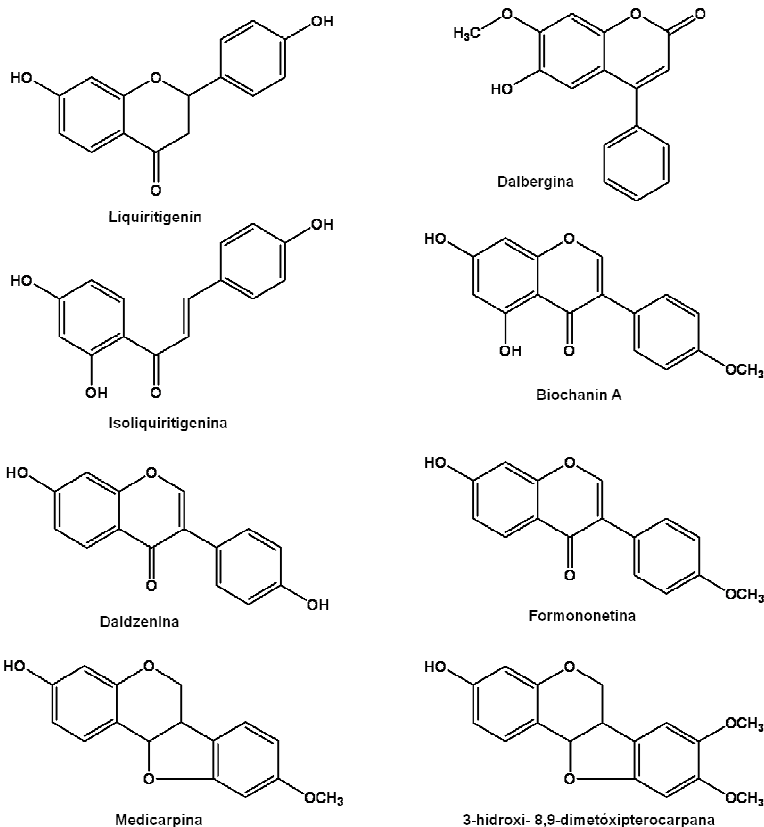
Popularmente esta espécie é conhecida como rabo-de-bugio, rabo-de-macaco (SILVA et al., 2008), marmelo-do-mangue, marmeleiro-da-praia (CARVALHO, 1997) moeda-de-videira, entre outros (FRANCIS, 2004). As cascas e raízes trituradas foram muito utilizadas por índios americanos na pesca, por possuírem substâncias químicas capazes de entorpecer e ajudar na captura de peixes. No Senegal suas folhas são colocadas em inalações e banhos para o tratamento de várias debilidades. Na medicina tradicional extratos são usados como diurético, emético e vermífugo, apesar de poderem apresentar toxicidade para alguns tecidos. (FRANCIS, 2004).

Estudos realizados por Dausch e colaboradores (2008) e Silva e colaboradores (2008), relataram que *D. ecastaphyllum* é a principal fonte de resina para a produção de um tipo de própolis, a própolis vermelha brasileira. Após analisar o perfil químico de *D. ecastaphyllum* e da própolis vermelha os autores constataram que ambos demonstraram ter constituintes químicos semelhantes, sendo os principais compostos os isoflavonóides medicarpina e 3-hidróxi-8,9-dimetóxiptero carpna (SILVA et al., 2008).

Os principais constituintes químicos já relatados para *D. ecastaphyllum* (Figura 5) são os isoflavonóides: liquiritigenina, daidizeína, dalbergina, isoliquiritigenina, formononetina, biochanin A, medicarpina e 3-hidróxi-8,9-dimetóxiptero carpna, sendo este último considerado o constituinte majoritário (ABREU MATOS; GOTTLIEB; SOUZA ANDRADE, 1975; DAUGSCH et al., 2008; DONNELLY; KEENAN; PRENDERGAST, 1973; SILVA et al., 2008).

---

<sup>1</sup> Prof. Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg – Depto de Botânica – UFSC, 2010 - comunicação pessoal



**Figura 5:** Principais constituintes químicos relacionados para *Dalbergia ecastaphyllum*.

### 3.3 Métodos para detecção de compostos com atividade antimicrobiana *in vitro*

Na maioria dos trabalhos presentes na literatura, os métodos mais utilizados para detecção da atividade antimicrobiana são ensaios *in vitro*, sem alvo específico, ou seja, não trazem informações sobre seu modo de ação, sendo realizados por difusão, diluição ou bioautografia. Através destas metodologias é possível, respectivamente, identificar se um extrato possui ou não atividade antimicrobiana, avaliar a intensidade dessa atividade e, por fim, relacionar os componentes bacteriostáticos ou

bactericidas e fungistáticos ou fungicidas do extrato (OSTROSKY et al., 2008; ZACHINO, 2001).

A bioautografia e o método de difusão são considerados ensaios qualitativos, uma vez que permitem detectar a presença ou ausência de compostos com atividade antimicrobiana. Por outro lado, os métodos de diluição são ensaios quantitativos, pois determinam a concentração mínima capaz de inibir o crescimento do microorganismo (OSTROSKY et al., 2008; VALGAS et al., 2007). Os métodos mais comumente utilizados para a triagem de extratos de espécies vegetais com potencial antimicrobiano são o de difusão em ágar e diluição em caldo (ALVES et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2007).

A seguir encontra-se uma breve revisão sobre as três metodologias citadas anteriormente, com ênfase sobre o método bioautográfico, visto ser uma metodologia mais recente, em comparação com os métodos de diluição e difusão, considerados clássicos e amplamente descritos (BOTZ; KOCSIS; NAGY, 2005).

### 3.3.1 Método por difusão

O método de difusão em ágar pode ser realizado através da técnica do disco, do poço ou template (ALVES et al., 2008). No método por difusão a amostra é depositada em um reservatório (discos de papel, poços ou cilindros de aço inoxidável/vidro no meio de cultura) em contato com o meio sólido inoculado com o microorganismo. Após ser mantido em estufa é medido o diâmetro das zonas de inibição formadas. O teste de difusão em disco é a metodologia aceita pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e estabelecida como padrão pela CLSI (*Clinical Laboratory Standard Institute*) antiga NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) e pela SBAC (Sociedade Brasileira de Análises Clínicas) (CLSI, 2002a; OSTROSKY et al., 2008; SBAC, 2010).

Este ensaio apresenta como vantagens a possibilidade de testar contra um único microorganismo, até seis extratos por placa, com a utilização de pequeno volume de amostra, além de ser considerada uma metodologia conveniente devido a sua simplicidade e baixo custo. O método por difusão não é apropriado para análise de compostos que não se difundem facilmente no ágar, sendo este parâmetro considerado a principal desvantagem do ensaio. São essenciais também para a boa

resolução dos resultados, a espessura e a uniformidade do ágar (OSTROSKY et al., 2008; SCORZONI et al., 2007).

### 3.3.2 Método por diluição

O método de diluição é realizado pela técnica de diluição em caldo, para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano (ALVES et al., 2008; OSTROSKY et al., 2008).

No método de diluição em caldo, quantidade conhecida da amostra é dissolvida homogeneamente em meio líquido, onde se inocula o microorganismo. Esta técnica é também denominada de macrodiluição quando realizada em tubos de ensaio ou de microdiluição quando utilizam-se placas de 80 ou 96 cavidades utilizando pequenos volumes de caldo (ALVES et al., 2008).

Por meio desta técnica é possível determinar quantitativamente a menor concentração do agente antimicrobiano ou menor concentração inibitória (CIM), a qual é capaz de inibir o crescimento do microorganismo. É possível detectar a presença de crescimento bacteriano ou fúngico pela presença de turbidez ou utilizando-se alguns sais indicadores de crescimento microbiano, como o sal de tetrazólio e resazurina ou, ainda, medindo-se a densidade óptica em espectrofotômetro, obtendo-se assim uma maior precisão (DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010; SCORZONI et al., 2007).

A CIM é um ensaio muito utilizado em laboratórios de análises clínicas para confirmar a resistência de um microorganismo e também monitorar a atividade de um novo agente antimicrobiano (DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010).

Considerando que neste método a turbidez é um indicador do crescimento microbiano, suas desvantagens são a dificuldade na detecção de contaminação no caso de teste de materiais clínicos (OSTROSKY et al., 2008) e a coloração, por exemplo, do extrato vegetal que está sendo avaliado e que pode influenciar na detecção dos resultados. O subcultivo dos tubos em placas contendo meio de cultura com ágar é uma alternativa para esse problema, sendo possível a obtenção da Concentração Bactericida Mínima (CBM) (DE OLIVEIRA et al., 2005; RIOS; RECIO; VILLAR, 1988)

### 3.3.3 Bioautografia

O método bioautográfico foi acrescentado aos tradicionais protocolos usados na pesquisa de produtos naturais com atividade antimicrobiana em 1946, por Goodall e Levi. Atualmente este método é bem difundido e usado principalmente por pesquisadores de laboratórios de química de produtos naturais, devido às facilidades encontradas no desenvolvimento do mesmo (VALGAS, 2002).

A bioautografia é um método de detecção pós-cromatográfico, baseada na separação de substâncias por cromatografia em papel ou cromatografia em camada delgada. Ensaios bioautográficos podem ser usados para detectar substâncias antibacterianas, antifúngicas, antiprotozoários e antioxidantes (COLORADO; GALEANO; MARTÍNEZ, 2007; HOSTETTMANN et al., 2008).

A finalidade deste tipo de ensaio é localizar e visualizar zonas de inibição de substâncias ou frações que foram aplicadas na cromatoplaça e que possuam atividade antimicrobiana. A principal vantagem desta técnica é permitir o isolamento de substâncias com atividades antimicrobianas com maior objetividade, as quais estão presentes em misturas complexas (COLORADO; GALEANO; MARTÍNEZ, 2007; HOSTETTMANN et al., 2008; POTTERAT; HAMBURGER, 2007).

Devido à sua diversidade e variabilidade, diversos fatores podem influenciar o método bioautográfico, tornando sua padronização difícil. Dessa forma, alguns parâmetros devem ser considerados, como fase móvel e seus aditivos, tipo de adsorvente, esterilização da cromatoplaça, microorganismo teste (tipo de crescimento e concentração do inóculo), tempo de incubação, reagentes de detecção e a utilização de estufa em atmosfera úmida (BOTZ; KOCSIS; NAGY, 2005). De acordo com estes autores os fatores principais para a otimização do ensaio são a qualidade da suspensão bacteriana e as condições de incubação das cromatoplaças.

Os métodos bioautográficos são geralmente divididos em três categorias: difusão no ágar ou bioautografia de contato, imersão ou método de sobreposição do ágar e bioautografia direta (SCORZONI et al., 2007).

### 3.3.3.1 Bioautografia de contato ou difusão no ágar

Neste método, as cromatoplasas são colocadas sobre a superfície das placas contendo o ágar previamente inoculado com o microorganismo. O princípio do método baseia-se na difusão do composto antimicrobiano (contato direto) da placa cromatográfica para a placa de ágar inoculado. As manchas com atividade antimicrobiana apresentam-se bem localizadas e as zonas de inibição podem ser facilmente visualizadas pelo uso de cepas de microorganismos adequados e principalmente pela atividade de reagentes de detecção. É um ensaio que pode ser aplicado a compostos polares ou moderadamente polares (BOTZ; KOCSIS; NAGY, 2005, KHURRAM et al., 2009).

### 3.3.3.2 Imersão ou método da sobreposição do ágar

Neste ensaio, a cromatoplasa é recoberta com o meio de cultura e depois da solidificação do ágar as placas são inoculadas com o microorganismo. Nesta variante, os compostos ativos aplicados na cromatoplasa devem difundir da fase estacionária para a camada de ágar. Após ser mantida em estufa, a placa é borrifada com sal de tetrazólio o qual é convertido em formazana e o microorganismo é corado, gerando zonas claras de inibição (CHOMA, 2005).

Nesta técnica há duas formas de aplicação do inóculo bacteriano: o primeiro ocorre pela aplicação da suspensão bacteriana na superfície do gel com o auxílio de swab e o segundo pela inoculação ou incorporação da bactéria ao ágar antes que este seja vertido sobre a cromatoplasa. Em estudo realizado comparando-se as duas formas de contato do inóculo, concluiu-se que ambas podem ser empregadas e que não há diferença significativa entre as mesmas (VALGAS, 2002).

O método da sobreposição do ágar é considerado essencial na bioautografia, pois o meio de cultura prevê condições ótimas para o crescimento bacteriano, entretanto, o uso de meio contendo ágar tem sido considerado a grande desvantagem desta técnica por dificultar a difusão dos compostos de baixa difusão, obtendo-se um contraste ruim (BOTZ; KOCSIS; NAGY, 2005).

### 3.3.3.3 Bioautografia direta

Este ensaio pode ser dividido em três partes: o cultivo do microorganismo para o teste, a separação cromatográfica e a detecção pós-cromatográfica (HORVÁTH et al., 2010). Neste método, uma cultura líquida do microorganismo é derramada ou borrifada sobre a cromatoplaça e a cultura do microorganismo cresce diretamente sobre a cromatoplaça (CHOMA, 2005; MASOKO; ELOFF, 2005; SHAI et al., 2008; SHAI; MCGAW; ELOFF, 2009)

O crescimento dos microorganismos só ocorre após as placas serem mantidas em estufa sob atmosfera úmida, sendo este fator, a principal dificuldade do método. A localização da atividade antimicrobiana pode ser facilmente visível assim como os compostos antibacterianos que aparecem como manchas claras sobre um fundo vermelho, devido a conversão do sal de tetrazólio em formazana. Nesta técnica não há a necessidade da difusão do adsorvente para o ágar e substâncias lipossolúveis e hidrossolúveis estão em contato direto com o microorganismo e o meio de crescimento (BOTZ; KOCSIS; NAGY, 2005).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Material vegetal

Informações sobre as espécies vegetais investigadas neste trabalho estão listadas no Quadro 3. Especificamente para *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub., partes aéreas foram coletadas em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, em Julho de 2010. O material vegetal foi identificado pelo Prof. Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg (Depto Botânica – UFSC) e material testemunho está depositado no Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina (FLOR 38173).

### 4.2 Preparação dos extratos

Folhas de *Dalbergia ecastaphyllum* L. Taub foram extraídas com etanol (EtOH 93°GL) por maceração. Após sete dias o etanol foi removido sob pressão reduzida e o extrato particionado com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol). Informações sobre a preparação dos extratos das demais espécies vegetais estão listadas no Quadro 3.



**Quadro 3:** Espécies vegetais selecionadas para a triagem antimicrobiana e informações sobre a preparação dos extratos

Nome Botânico	Local da coleta	Exsicata	Parte da planta utilizada	Preparação do extrato
<i>Cecropia pachystachia</i>	Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil	ICN 150025	Folhas	Infusão aquosa
<i>Dalbergia ecastaphyllum</i> L. Taub.	Florianópolis, Santa Catarina, Brasil	FLOR 38173	Folhas, Casca das sementes, Sementes	Maceração com EtOH 93°
<i>Dodonaea viscosa</i> Jacq	Florianópolis, Santa Catarina, Brasil	FLOR 38174	Folhas	Maceração com EtOH 93°
<i>Garcinia gardneriana</i>	Turvo, Santa Catarina, Brasil	CRI 7616	Folhas, Frutos	Refluxo H <sub>2</sub> O
<i>Ilex paraguariensis</i>	Erechim, Rio Grande do Sul, Brasil	RSPF 11074	Folhas	Refluxo H <sub>2</sub> O e EtOH 40°
<i>Musa x paradisiaca</i> L.	Florianópolis, Santa Catarina, Brasil		Folhas	Decocção com EtOH 40°
<i>Passiflora alata</i>	Urussanga, Santa Catarina, Brasil	FLOR 37823	Pericarpo, Polpa, Sementes	Decocção com EtOH 40°
<i>Passiflora edulis</i> Sims var. <i>edulis</i>	SantaSofia/Boyacá Colômbia	COL 530661	Folhas, Pericarpo	Infusão aquosa
<i>Passiflora manicata</i> Juss.	Villa de Leywa, Boyacá, Colômbia	COL 530662	Folhas	Infusão aquosa
<i>Passiflora quadrangularis</i> Linneaus	Neiva/Huila, Colômbia		Folhas, Pericarpo	Infusão aquosa

Nome Botânico	Local da coleta	Exsicata	Parte da planta utilizada	Preparação do extrato
<i>Passiflora tripartita</i> var. <i>mollissima</i> Holm-Nielsen & Møller Jørgensen	Santa Sofia/Boyacá Colômbia	COL 530663	Folhas, Pericarpo	Infusão aquosa
<i>Wilbrandia ebracteata</i>	Nova Petrópolis, Rio Grande do Sul, Brasil	ICN 95292	Raízes	Maceração com EtOH 93° e CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>

### 4.3 Ensaios antimicrobianos

#### 4.3.1 Método de difusão em disco

A atividade antibacteriana e antifúngica foi avaliada pelo método de difusão em disco conforme normas preconizadas pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS, 2002a).

Foram preparadas suspensões, através do método direto, inoculando-se colônias do microorganismo a ser testado em solução fisiológica esterilizada até atingir a concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Esta suspensão foi medida em espectrofotômetro (PerkinElmer<sup>®</sup>, Lambda 25 UV/VIS) no comprimento de onda de 625 nm, correspondendo a uma absorbância entre 0,08 a 0,10.

Em placas de petry contendo o meio de cultura ágar Muller-Hinton (HIMEDIA<sup>®</sup>), a suspensão do microorganismo foi inoculada com o auxílio de swab, através da técnica de três direções. Discos de papel filtro com diâmetro de 6 (seis) mm foram impregnados com o extrato na concentração de 2 mg/disco e em seguida, colocados nas placas com o meio de cultura previamente inoculado, juntamente com o controle positivo e negativo do teste.

Disco de papel filtro contendo 20 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth<sup>®</sup>), foram usados como controle negativo, no qual nenhuma inibição foi observada. Como controle positivo, utilizou-se discos de antibiótico padrão previamente selecionados de acordo com a sensibilidade dos microorganismos testados. Frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), utilizou-se disco de Oxacilina 1 µg (DME<sup>®</sup>) (halos de inibição entre 18 – 24 mm), para *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) Ampicilina 10 µg (DME<sup>®</sup>) (halos > 17 mm e 16 - 22 mm, respectivamente), frente a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) Ceftazidina 30 µg (DME<sup>®</sup>) (halos entre 22 - 29 mm) e para o fungo *Candida albicans* (ATCC 10231) fluconazol 25 µg (Cecon<sup>®</sup>) (halos > 19 mm).

As placas foram mantidas em estufa a 35°C (±1°C) e após 18 h os diâmetros dos halos de inibição foram medidos. Os testes foram realizados em triplicata e somente os extratos que apresentaram halo superior ou igual a 10 mm foram submetidos aos ensaios de CIM e bioautografia.

#### 4.3.2 Concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM do extrato e frações foi determinada pelo ensaio de macrodiluição conforme normas preconizadas pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS, 2002b). Aos tubos de ensaio contendo 950  $\mu\text{L}$  do caldo BHI (Infusão de Cérebro e Coração) (HIMEDIA<sup>®</sup>) foram adicionadas 50  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) e 1000  $\mu\text{L}$  das seis diluições do extrato ou fração nas seguintes concentrações: 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3.125 mg/mL. Como controle positivo utilizou-se cloranfenicol (INLAB<sup>®</sup>) na concentração de 4 mg/mL. Os tubos foram mantidos em estufa a 35°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) por 18 h e os valores de CIM determinados como a menor concentração do extrato que inibiu completamente o crescimento do microorganismo.

Os tubos que não apresentaram crescimento visível após 18 horas foram subcultivados em placas contendo ágar nutriente (HIMEDIA<sup>®</sup>). Este ensaio foi realizado em duplicata e a viabilidade do microorganismo avaliada após 18 h a 35°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). A menor concentração do extrato que inibiu a multiplicação bacteriana foi definida como a concentração bactericida mínima (CBM).

#### 4.3.3 Bioautografia

Nas placas cromatográficas (Merck 60 F<sub>254</sub> 10 x 10 cm) foram aplicados 2 mg de cada extrato ou fração. As placas foram migradas empregando acetato de etila:ácido fórmico:água (20:1:1 v/v) como fase móvel. Após a evaporação do solvente, 40 mL do meio de cultura ágar Muller Hinton (HIMEDIA<sup>®</sup>) foi depositado sobre a cromatoplaça, e após sua solidificação a suspensão padrão do microorganismo a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL foi inoculada sobre a mesma com o auxílio do swab.

As placas foram mantidas em estufa a 35°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) e após 18 h o bioautograma foi nebulizado com uma solução aquosa a 0,5% (m/v) de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (TTC) (Vetec<sup>®</sup>) e novamente levado a estufa a 35°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) por 4 horas. A presença de substância(s) ativa(s) foram caracterizadas por halo(s) de inibição em torno da(s) banda(s) cromatográfica(s) (HOLETZ et al., 2002).

### 4.4 Caracterização química do extrato de *Dalbergia ecastaphyllum*

#### 4.4.1 Teor de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais do extrato etanólico e frações de *D. ecastaphyllum* foi determinado pelo ensaio de Folin-Ciocalteu como

descrito previamente por Singleton; Orthofer; Lamuela-Raventos (1999); Kappel e colaboradores (2008) com pequenas modificações. Resumidamente, 100 µL do extrato ou frações (1mg/mL) foram misturadas com 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu e 200 µL de carbonato de sódio (25%, m/v). A mistura foi diluída com 2 mL de água destilada e após 2 horas, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (PerkinElmer<sup>®</sup>, Lambda 25 UV/VIS) a 726 nm. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de fenólicos totais expresso pela média ± desvio padrão em equivalentes de ácido gálico (EAG) em g/100g de extrato seco.

#### 4.4.2 Cromatografia em camada delgada

A presença de diferentes constituintes no extrato bruto e frações de *Dalbergia ecastaphyllum*, foi avaliada por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica (Merck 60 F<sub>254</sub> 20 x 20 cm), utilizando acetato de etila:ácido fórmico:água (20:1:1 v/v) como fase móvel. Como agentes de detecção foram utilizados reagente natural, vanilina sulfúrica e cloreto férrico (WAGNER; BLADT, 1996).

#### 4.5 Análise estatística

As diferenças entre os teores de fenólicos do extrato e frações foram analisadas por ANOVA de uma via, seguida de pós teste Newman-Keuls (SNK). O Coeficiente de correlação de Spearman foi usado para o teste de correlação entre teor de fenólicos totais e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Utilizou-se o programa GraphPad Prism<sup>®</sup> (versão 5,00) (MackievTM) sendo que um valor de  $p < 0,05$  foi aceito como estatisticamente significativo.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foi realizada uma triagem de atividade antimicrobiana de 22 extratos de espécies vegetais pelo método de difusão em disco, por ser uma técnica simples e de baixo custo. Nesta triagem (tabela 1) foi possível detectar atividade antibacteriana dos extratos das folhas de *D. viscosa* e *C. pachystachya*, das folhas e frutos de *G. gardneriana* e das folhas e casca de *D. ecastaphyllum*, frente a *S. aureus* e *E. faecalis*, todos na concentração de 2 mg/disco. Todos os extratos testados não foram ativos frente às bactérias *P. aeruginosa*, *E. coli* e ao fungo *C. albicans*.

Na literatura, não há relatos sobre a atividade antimicrobiana de *C. pachystachia*, muito embora estudos químicos apontem para predominância de flavonóides em sua composição química (COSTA et al., 2011). Para espécies do gênero *Garcinia* como *G. kola* e *G. livingstonei*, existem diversos relatos que demonstram atividade frente a *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *E. coli* obtidos de isolados clínicos (AKERELE et al., 2008; CHOMNAWANG et al., 2005; KAIKABO; SAMUEL; ELOFF, 2009; SIBANDA; OLANIRAN; OKOH, 2010). No que concerne ao gênero *Dodonaea* na literatura foram encontrados 13 trabalhos relacionados à investigação antimicrobiana deste gênero. Dentre estes, destaca-se o trabalho realizado por Teffo; Aderogba; Eloff (2010) onde são descritos quatro flavonóides isolados das folhas de *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* (3,5,7-triidroxi-4-metoxiflavona, 5,7,4-triidroxi-3,6-dimetoxiflavona, 5,7-diidroxi-3,6,4-trimetoxiflavona e 5-hidroxi-3,7,4-trimetoxiflavona) e que apresentaram atividade frente a *S. aureus* (ATCC 29213), *E. faecalis* (ATCC 29212), *P. aeruginosa* (ATCC 25922) e *E. coli* (ATCC 27853) com valores de concentração inibitória mínima que variaram em uma faixa de 16 µg/mL a 250 µg/mL.

**Tabela 1:** Halos de inibição (em mm) da triagem antibacteriana e antifúngica pelo método de difusão em disco.

Nome Botânico	Extratos	Microorganismos				
		<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Cecropia pachystachya</i>	Folhas- Extrato Bruto	7	-	-	-	-
<i>Dalbergia ecastaphyllum</i>	Folhas- Extrato Bruto	11	10	-	-	-
	Casca da semente - Extrato Bruto	9,5	9,5	-	-	-
	Sementes- Extrato Bruto	-	-	-	-	-
<i>Dodonaea viscosa</i> Jacq	Folhas- Extrato Bruto	8	-	-	-	-
<i>Garcinia gardneriana</i>	Folhas- Extrato Bruto	9	-	-	-	-
	Frutos- Extrato Bruto	7,5	7	-	-	-
<i>Ilex paraguariensis</i>	Folhas- Extrato Bruto (Aquoso)	-	-	-	-	-
	Folhas- Extrato Bruto (EtOH 40°)	-	-	-	-	-
<i>Musa x paradisiaca</i> L.	Folhas- Extrato Bruto	-	-	-	-	-
<i>Passiflora alata</i>	Pericarpo- Extrato Bruto	-	-	-	-	-
	Polpa- Extrato Bruto	-	-	-	-	-
	Sementes- Extrato Bruto	-	-	-	-	-
<i>Passiflora edulis</i> Sims var. <i>edulis</i>	Folhas- Extrato Bruto	-	-	-	-	-
	Pericarpo- Extrato Bruto	-	-	-	-	-

Nome Botânico	Extratos	Microorganismos				
		<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Passiflora manicata</i> Juss	Folhas- Extrato Bruto	-	-	-	-	-
<i>Passiflora quadrangularis</i> Linneaus	Folhas- Extrato Bruto	-	-	-	-	-
	Pericarpo- Extrato Bruto	-	-	-	-	-
<i>Passiflora tripartita</i> var. <i>mollissima</i> Holm-Nielsen & Møller Jørgensen	Folhas- Extrato Bruto	-	-	-	-	-
	Pericarpo- Extrato Bruto	-	-	-	-	-
<i>Wilbrandia ebracteata</i>	Raízes- Extrato Bruto (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	-	-	-	-	-
	Raízes- Extrato Bruto (EtOH)	-	-	-	-	-
Controles positivo	Oxacilina (1µg)	18-24	-	-	-	-
	Ampicilina (10µg)	-	> 17	16 - 22	-	-
	Ceftazidina (30µg)	-	-	-	22 - 29	-
	Fluconazol (25 µg)	-	-	-	-	> 19

(-): Não ativo.

Controle Positivo: *S. aureus*: oxacilina (1µg) 18 - 24 mm; *E. faecalis*: ampicilina (10µg) > 17 mm; *P. aeruginosa*: ceftazidina (30µg) 22 - 29 mm; *E. coli*: ampicilina (10µg) 16 - 22 mm; *Candida albicans*: fluconazol (25 µg) > 19 mm.



Já o gênero *Dalbergia* possui um número significativo de investigações quanto às suas propriedades antibacterianas e antifúngicas. Destacam-se *Dalbergia paniculata* (RAMACHANDRAIAH, 1991), *D. parviflora* e *D. pseudo-sisso* (CHUNG et al., 2004), *D. melanoxylon* (GUNDIDZA; GAZA, 1993), *D. sissoo* (BRIJESH et al., 2006), *D. horrida* (NARAYANAN et al., 2007), *D. saxatilis* (OKWUTE et al., 2009), *D. oliveri* (DEESAMER et al., 2007) e *D. subcymosa* (CORREIA et al., 2008).

Conforme anteriormente citado foi constatado que os extratos aqui investigados apresentaram atividade frente às bactérias *S. aureus* e *E. faecalis*, mas não foram ativos frente às bactérias *P. aeruginosa* e *E. coli*.

Na literatura, a ausência de atividade frente a bactérias gram negativas pelo método de difusão, foi observada também para o extrato aquoso das folhas de *D. sissoo* (BRIJESH et al., 2006) e para o extrato etanólico das cascas de *D. subcymosa* (CORREIA et al., 2008). Adicionalmente, Okwute e colaboradores (2009) verificaram que o extrato etanólico das folhas e cascas de *D. saxatilis* também não apresentaram atividade frente à mesma cepa ATCC do fungo *C. albicans* empregada neste trabalho.

Contudo, neste último estudo, o extrato das cascas de *D. saxatilis* apresentou resultados satisfatórios frente a bactérias gram negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* (OKWUTE et al., 2009), o que pode ser justificado pela diferença na constituição química entre *D. saxatilis* e *D. ecastaphyllum*, considerando que os autores sugerem que a atividade biológica de *D. saxatilis* está associada a presença de ésteres de ácidos graxos, esteróis e fenóis presentes nas cascas desta espécie.

A atividade frente à *S. aureus* foi verificada para o extrato metanólico das folhas e cascas de *D. parviflora* e *D. pseudo sisso*, pelo método de difusão em disco na concentração de 50 mg/mL (CHUNG et al., 2004). Em outro estudo, foi observada atividade do extrato etanólico das cascas de *D. subcymosa* frente à cepa multiresistente de *S. aureus* pelo mesmo método, na concentração de 20 µg (CORREIA et al., 2008)

É importante ressaltar que as atividades dos extratos previamente relatadas frente a *S. aureus*, apesar de serem em concentrações inferiores às obtidas em nosso estudo, referiam-se ao extrato bruto de outras espécies do gênero e não de *D. ecastaphyllum*. Além disso, os dados descritos na literatura detectaram atividade antibacteriana somente frente à *S. aureus*, enquanto em nosso estudo, foi

detectada atividade frente às duas cepas de bactérias gram positivas testadas (*S. aureus* e *E. faecalis*).

Considerando os resultados obtidos para o extrato bruto de *D. ecastaphyllum* e que o fracionamento é o primeiro passo na identificação de compostos bioativos de produtos naturais (HAYACIBARA et al., 2005), o extrato etanólico das folhas de *D. ecastaphyllum* foi particionado com solventes de polaridade crescente: hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (BuOH) para a realização de novos ensaios de difusão em disco, de macrodiluição ou bioautográficos.

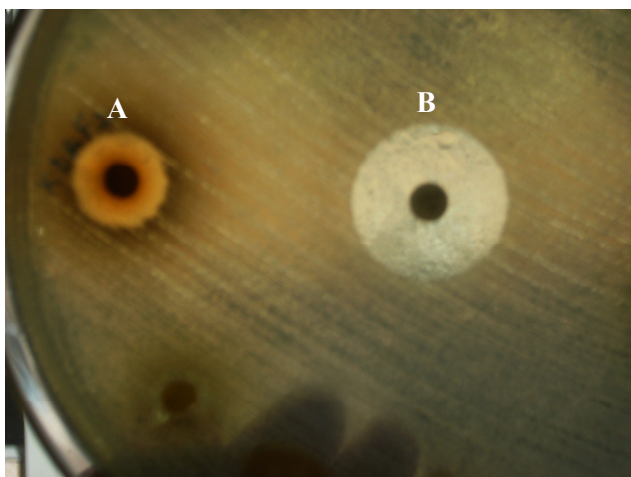
Os resultados encontrados, através do método de difusão em disco, para as frações do extrato etanólico das folhas de *D. ecastaphyllum* estão listados na Tabela 2 e o maior halo de inibição encontrado está demonstrado na Figura 6.

**Tabela 2:** Halos de inibição (em mm) das frações do extrato etanólico das folhas de *Dalbergia ecastaphyllum* pelo método de difusão em disco

Frações		Microorganismos				
		<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Hexano		-	-	-	-	-
Diclorometano		-	-	-	-	-
Acetato de etila		14	12	-	-	-
<i>n</i> -butanol		8	-	-	-	-
Controles positivo	Oxacilina (1µg)	18 - 24	-	-	-	-
	Ampicilina (10µg)	-	> 17	16-22	-	-
	Ceftazidina (30µg)	-	-	-	22 - 29	-
	Fluconazol (25µg)	-	-	-	-	> 19

(-) : Não ativo.

Controle Positivo: *S. aureus*: oxacilina (1µg) 18 - 24 mm; *E. faecalis*: ampicilina (10µg) >17 mm; *P. aeruginosa*: ceftazidina (30µg) 22 - 29 mm; *E. coli*: ampicilina (10µg) 16 - 22 mm; *Candida albicans*: fluconazol (25 µg) >19 mm.



**Figura 6:** Halo de inibição da fração acetato de etila do extrato etanólico de *Dalbergia ecastaphyllum*. (A) Fração acetato de etila (14 mm) (B) Controle. Positivo: *S. aureus*: oxacilina (1 µg) 22 mm.

Com isso, o extrato bruto e as frações que apresentaram atividade foram submetidos ao ensaio de macrodiluição com a finalidade de se determinar a concentração inibitória mínima. Considerando que nesta metodologia a turbidez é um indicador do crescimento bacteriano e a coloração do extrato e das frações influencia na detecção dos resultados, após o crescimento de 18 horas todos os tubos contendo o meio de cultura foram subcultivados em placas com ágar nutriente a fim de se obter a concentração bactericida mínima (CBM).

A concentração bactericida mínima das frações obtidas a partir do extrato etanólico das folhas de *D. ecastaphyllum* variou de 50 mg/mL a 6,25 mg/mL (tabela 3). O extrato bruto apresentou a CBM mais elevada para as duas bactérias gram positivas (50 mg/mL). Por outro lado, a fração AcOEt apresentou CBM de 50 mg/mL frente a *E. faecalis* e atividade antibacteriana mais potente, com CBM de 6,25 mg/mL frente a *S. aureus*. A concentração bactericida mínima do antibiótico padrão utilizado, cloranfenicol, foi de 4,0 mg/mL.

**Tabela 3:** Concentração Bactericida Mínima (CBM) (em mg/mL) do extrato bruto e frações das folhas de *Dalbergia ecastaphyllum*.

Extrato e frações	Microorganismos	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
Extrato Bruto	50	50
Acetato de etila	6,25	50
<i>n</i> - butanol	25	-

(-): Não ativo

Controle positivo: Cloranfenicol (CBM) 4 mg/mL

Na literatura, Gundidza; Gaza (1993) demonstraram que a CBM dos extratos etanólico e ácido cítrico das cascas de *Dalbergia melanoxylon*, variou de 142 µg/ml a 5,72 µg/ml frente às bactérias: *E. coli* (NCIB 8879), *P. aeruginosa* (NCIB 950), *S. typhimurium* (NCTC 1074), *Y. pestis* (NCTC 10460), *B. subtilis* (NCIB 3610), *K. pneumoniae* (NCIB 418) e *S. aureus* (NCIB 6571).

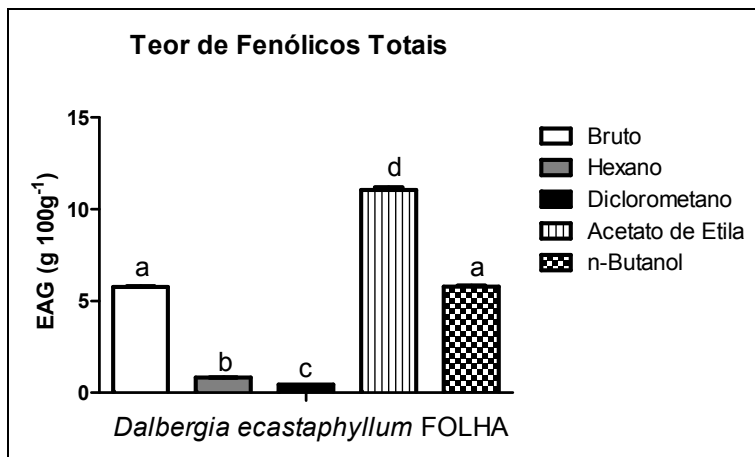
Embora a diferença dos resultados apresentados no trabalho acima citado e em nossos resultados seja significativa, não é possível estabelecer uma comparação direta entre eles, visto que além das espécies serem distintas, as partes das plantas utilizadas, os métodos e os líquidos extratores, assim como as cepas bacterianas avaliadas, são diferentes daquelas aqui testadas.

A maioria dos trabalhos que relatam a atividade antimicrobiana de espécies de *Dalbergia* não realizam a caracterização química dos extratos. Somente os trabalhos de Deesamer e colaboradores (2007) e Narayanan e colaboradores (2007) descrevem que a atividade antimicrobiana detectada se deve aos flavonóides (isoflavonas).

Dessa forma, foi realizada a caracterização química dos extratos, avaliando-se o teor de fenólicos totais do extrato bruto e de suas respectivas frações, além da avaliação do perfil químico dessas amostras por cromatografia em camada delgada.

O teor de compostos fenólicos do extrato bruto e das frações das folhas de *D. ecastaphyllum* está demonstrado na Figura 7 e foi expresso em equivalentes de ácido gálico em g/100 g de extrato seco, variando de 0,46 ( $\pm 0,003$ ) a 11,05 ( $\pm 0,128$ ) com diferenças estatisticamente significativas, exceto entre extrato bruto e fração BuOH. O maior teor de compostos fenólicos foi observado na fração AcOEt (11,05  $\pm 0,128$ ), seguido da fração BuOH (5,78  $\pm 0,064$ ), do

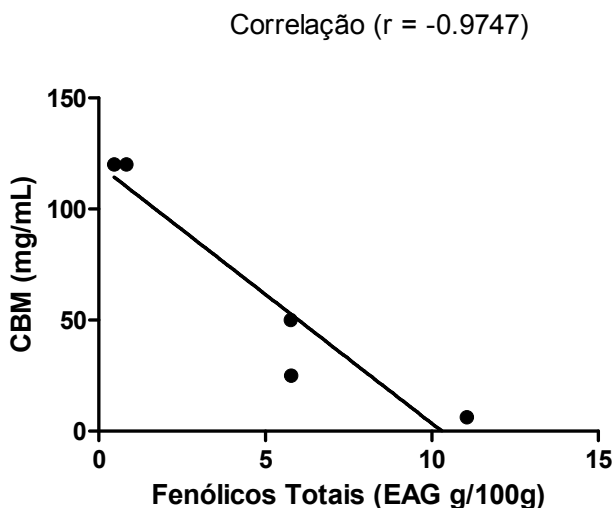
extrato bruto ( $5,76 \pm 0,049$ ), da fração HEX ( $0,82 \pm 0,009$ ) e da fração DCM ( $0,46 \pm 0,003$ ).



**Figura 7:** Teor de fenólicos totais do extrato etanólico e frações das folhas de *Dalbergia ecastaphyllum*. Dados são expressos pela média  $\pm$  desvio padrão em Equivalentes de Ácido Gálico em g/100g de extrato seco ( $n = 3$ ). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ).

O Coeficiente de Correlação de Spearman demonstrou uma correlação negativa entre a Concentração Bactericida Mínima frente a *S. aureus* e o conteúdo de fenólicos do extrato e frações das folhas de *D. ecastaphyllum* (Figura 8), pois a fração AcOEt apresentou uma menor CBM ( $6,25 \text{ mg/mL}$ ) e um maior teor de compostos fenólicos ( $11,05 \pm 0,128 \text{ EAG em g/100 g de extrato seco}$ ), sugerindo que eles poderiam ser os responsáveis pela atividade antibacteriana encontrada. Esta correlação demonstra que quanto mais elevado o teor de compostos fenólicos, maior é o potencial antimicrobiano.

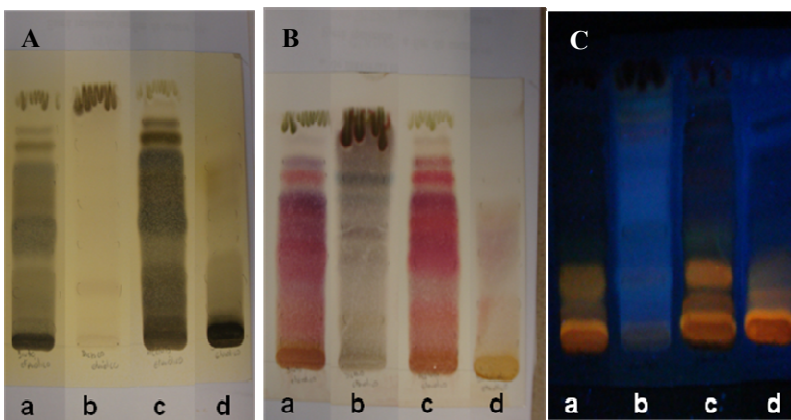
Adicionalmente, realizou-se o coeficiente de correlação de Spearman com o teor de fenólicos totais e os valores de CBM frente a *E. faecalis*, no entanto, esta correlação foi não significativa, com  $p > 0,05$ .



**Figura 8:** Coeficiente de Correlação de Spearman entre o conteúdo de fenólicos totais (EAG g/100g extrato seco) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em mg/mL frente a *Staphylococcus aureus* ( $r = -0.9747$   $p < 0,05$ ).

Como os resultados deste trabalho sugeriam que a atividade antibacteriana estaria presente em maior parte na fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *D. ecastaphyllum*, e que esta atividade estaria relacionada ao teor de fenólicos totais, realizou-se uma análise por cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato bruto e das respectivas frações.

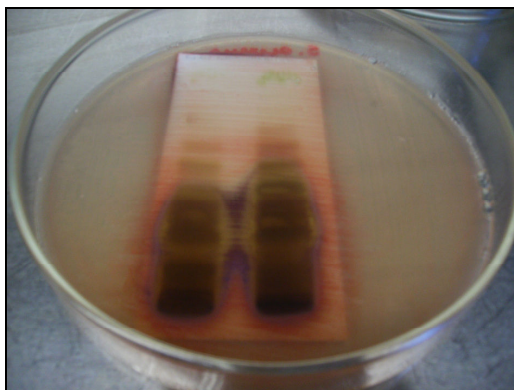
O perfil cromatográfico da CCD, empregando como agente de detecção cloreto férrico (Figura 9A) apresentou compostos com coloração característica de taninos, especialmente na fração acetato de etila, a qual apresentou maior número de compostos e intensidade de coloração. Com a utilização de vanilina sulfúrica como agente de detecção (Figura 9B), novamente é possível observar uma maior concentração de substâncias na fração acetato de etila, sendo a coloração verificada para os compostos majoritários condizente com a classe de taninos tipo condensados. Por fim, quando utilizado reagente natural seguido de visualização no UV (366 nm), o perfil cromatográfico obtido indicou a presença de poucos compostos com coloração característica de flavonóides, especialmente nas frações acetato de etila e *n*-butanol (Figura 9C).



**Figura 9:** CCDs do extrato bruto e frações de *Dalbergia ecastaphyllum*. Agentes de detecção cloreto férrico (A), vanilina sulfúrica (B), reagente natural visualização UV 366 nm (C). Letra a = extrato bruto, b = Fração DCM, c = Fração AcOEt, d = Fração BuOH.

O comportamento cromatográfico das substâncias nestas análises permite sugerir que os compostos bioativos da fração AcOEt correspondem à classe dos flavonóides e taninos condensados, sendo estes últimos considerados os constituintes majoritários, o que pode justificar a forte atividade detectada frente a *S. aureus* (CBM = 6,25 mg/mL) desta fração quando comparada ao extrato bruto (CBM = 50 mg/mL) e a fração BuOH (CBM = 25 mg/mL).

No intuito de confirmar esta hipótese e de determinar quais compostos da fração AcOEt são responsáveis pelo potencial antibacteriano foi realizado um ensaio bioautográfico utilizando o mesmo sistema cromatográfico descrito anteriormente. No ensaio bioautográfico com a fração acetato de etila (Figura 10), observou-se uma intensa zona de inibição em torno das substâncias com atividade antibacteriana que, comparando-se com as CCDs da figura 9, estão localizadas em valores de  $R_f$  entre 0,2 – 0,6, correspondentes aos valores encontrados para flavonóides e especialmente os taninos condensados.



**Figura 10:** Bioautografia da fração acetato de etila frente a *Staphylococcus aureus* após revelação com Cloreto de Trifeniltetrazólio 0,5%.

A atividade antimicrobiana referente a estes compostos já foi relatada por outros autores. Souza e colaboradores (2007) comprovaram que a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da casca de *Stryphnodendron adstringens*, conhecido popularmente como barbatimão, está relacionada aos taninos presentes nesta espécie. Dugasani e colaboradores (2010) também verificaram que o extrato metanólico e acetato de etila das raízes de duas espécies de *Bauhinia* (*B. tomentosa* e *B. vahlii*), apresentaram atividade antimicrobiana e que a mesma está relacionada à presença de compostos fenólicos da classe dos taninos e dos flavonóides.

Taninos vêm sendo descritos na literatura pela sua atividade bacteriostática e bactericida. Epicatequina e catequina, taninos condensados isolados do extrato etanólico das cascas de *Schotia latifolia* Jacq apresentaram atividade frente à *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* obtidos de isolados clínicos, com CIMs que variaram de 62,5 a 250 µg/mL (MASIKA; SULTANA; AFOLAYAN, 2004).

Um tanino isolado da fração acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *Vangueria spinosa* Roxb. e identificado como (-)-epicatequina-3-O-β-glucopiranosídeo apresentou atividade frente a *S. aureus* (MTCC 2940), *E. coli* (MTCC 739), *P. aeruginosa* (MTCC 2453) e *K. pneumoniae* (MTCC 432) com CIMs que variaram de 1,5 – 3,1 mg/mL (CHATTERJEE; BHATTACHARJEE; CHANDRA, 2011).

Os mecanismos de ação antimicrobianos identificados até o momento para os taninos sugerem que estes compostos possuem a habilidade de inativar adesinas, enzimas e proteínas microbianas, as



quais estão envolvidas em mecanismos de transporte celular. Outros mecanismos incluem a privação dos substratos necessários para o crescimento microbiano e a ação direta sobre o metabolismo dos microorganismos através da inibição da fosforilação oxidativa (PERUMAL SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2010; SCALBERT, 1991).

A atividade antimicrobiana de flavonóides também possui um significativo número de estudos na literatura. Rutina isolada do extrato metanólico das folhas de *Solanum palinacanthum* apresentou atividade frente às bactérias *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. aureus* (ATCC 25923) e ao fungo *Aspergillus ochraceus*, isolado dos grãos de café, com CIMs que variaram de 1000 µg/mL a 35 µg/mL (PEREIRA et al., 2008).

A atividade de flavonóides como 5,7-dimetóxi-flavanona-4-*O*-β-D-glucopiranosídeo, 5,7-dimetóxi-flavanona-4-*O*-[2''-*O*-(5'''-*O*-trans-cinnamoyl)-β-D-apiofuranosil]-β-D-glucopiranosídeo, 5,7,3'-trihidróxi-flavanona-4-*O*-β-D-glucopiranosídeo, naringenina -7- *O*- β -D-glucopiranosídeo, rutina e nicotiflorina foram investigadas frente a *E. coli* ATCC (25922), *P. aeruginosa* (ATCC 10145), *P. mirabilis* (ATCC 7002), *K. pneumoniae* (RSKK 574), *A. baumannii* (RSKK 02026), *S. aureus* (ATCC 25923), *E. faecalis* (ATCC 29212), *B. subtilis* (ATCC 6633), *C. albicans* ATCC (10231) e *C. krusei* (ATCC 6258). Todos os compostos testados apresentaram forte atividade antimicrobiana frente a *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. krusei* com CIMs que variaram de 32-128 µg/mL (ORHAN et al., 2010).

O uso de flavonóides em infecções bacterianas possui mecanismos de ação que ainda não estão completamente conhecidos, no entanto, o mecanismo antibacteriano proposto até o momento baseia-se na sua relação estrutura atividade e envolve a inibição da síntese de ácidos nucleicos, da função da membrana citoplasmática e do metabolismo de energia (CAZAROLLI et al., 2008).

Atualmente, espécies vegetais que contém altos teores de compostos fenólicos são alvos de interesse, devido a potencial propriedade antioxidante destas substâncias e por atuarem como poderosos agentes anti-infecciosos (SALEEM et al., 2010). O provável mecanismo responsável pela toxicidade de compostos fenólicos frente a microorganismos pode estar ligada à inibição de enzimas, possivelmente através de reações com grupos sulfidrilas ou pode estar relacionada à

capacidade que estes compostos possuem de complexarem-se às proteínas extracelulares da membrana bacteriana, levando a sua inativação e conseqüente morte bacteriana (COWAN, 1999; SIDDIQI et al., 2001).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos de triagem antimicrobiana a partir de espécies vegetais, em busca de novas substâncias com alto valor terapêutico estão em constante crescimento (AYRES et al., 2008; HOLETZ et al., 2002; MARZOUK et al., 2009; ROJAS et al., 2006; RUNYORO et al., 2006). Isso se deve pela aceitação da medicina tradicional como uma alternativa nos cuidados à saúde, pela busca de novos compostos bioativos ou protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos e principalmente devido ao aumento da resistência de bactérias e fungos aos antimicrobianos disponíveis atualmente na prática clínica (LIVERMORE et al., 2005; NOSTRO et al., 2000; PERUMAL SAMY; GOPALAKRISHNAONE, 2010; PIETERS; VLIETINCK, 2005).

Embora diversos antibióticos disponíveis hoje no mercado sejam produtos de síntese ou semi-síntese como sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas, a maioria das classes de antimicrobianos disponíveis atualmente para uso clínico, como penicilinas, cefalosporinas, tetraciclina, aminoglicosídeos, cloranfenicol, rifampicinas entre outros, são oriundos de produtos de origem natural (microorganismos como bactérias e fungos) (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

A partir do ano 2000, poucos fármacos foram introduzidos para a terapêutica antimicrobiana, fato que induziu a retomada dos programas de descoberta de antibióticos de fontes naturais em algumas indústrias farmacêuticas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010, TAKAHASHI; LUCAS, 2008). Nesse contexto, as espécies vegetais podem contribuir na descoberta de novos antibióticos, pois é possível que produtos naturais possam ser biossintetizados para prevenir e/ou combater o ataque de microorganismos patogênicos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

A triagem preliminar da atividade biológica de um extrato bruto é a primeira etapa antes da realização de futuros ensaios farmacológicos e químicos de espécies vegetais, pois ao se encontrar resultados promissores iniciam-se os estudos de caracterização química e do possível mecanismo de ação dos extratos envolvidos nesta atividade (CORREIA et al., 2008).

Para a realização de ensaios de triagem da atividade biológica por meio do ensaio de difusão em disco é indispensável a utilização de controle positivo (discos impregnados com antibióticos), os quais são selecionados de acordo com a sensibilidade dos microorganismos. O uso

destes controles positivos serve como garantia de que a metodologia utilizada cumpra com os requisitos estabelecidos pela CLSI, visto que as bactérias testadas são cepas padrão ATTC. Desta forma, não é possível realizar a comparação dos halos de inibição dos controles positivos utilizados no ensaio com os resultados obtidos com as amostras.

Considerando que na literatura há informações da atividade antimicrobiana de espécies do gênero *Dalbergia*, e que não há relatos a respeito da atividade antimicrobiana de *Dalbergia ecastaphyllum*, em nosso estudo, o extrato etanólico das folhas desta espécie foi investigado frente a quatro bactérias e um fungo, apresentando atividade antimicrobiana para *S. aureus* e para *E. faecalis*. Considerando os resultados obtidos para o extrato bruto da espécie em estudo, optou-se pela realização do fracionamento bioguiado deste, pois o fracionamento bioguiado consiste, inicialmente, na obtenção de frações mais puras ou com maior concentração de compostos bioativos as quais são monitoradas através de novos ensaios de atividade farmacológica (HOUGHTON, 2000).

Em nossos resultados, observou-se atividade antimicrobiana do extrato e frações somente frente a bactérias gram positivas (*S. aureus* e *E. faecalis*). Adicionalmente, uma correlação negativa entre a Concentração Bactericida Mínima frente a *S. aureus* e o conteúdo de fenólicos do extrato e frações das folhas de *D. ecastaphyllum* foi verificada, sendo a fração acetato de etila a que apresentou atividade antibacteriana mais potente frente a *S. aureus* com CBM de 6,25 mg/mL e alta concentração de compostos fenólicos. Desta forma, é possível justificar a forte atividade detectada frente a *S. aureus* (CBM = 6,25 mg/mL) desta fração quando comparada ao extrato bruto (CBM = 50 mg/mL) e a fração BuOH (CBM = 25 mg/mL).

Em nosso trabalho, utilizou-se também a bioautografia por imersão ou sobreposição do ágar. Nesta técnica o extrato ou frações ativas são aplicados na cromatoplaça e devem difundir da fase estacionária para a camada de ágar (CHOMA, 2005; COS et al., 2006). A bioautografia é uma técnica capaz de detectar e localizar, através de um cromatograma as substâncias com atividade, em misturas complexas, através de sua separação, e permitir o isolamento dos compostos bioativos (COLORADO; GALEANO; MARTÍNEZ, 2007; HOSTETTMANN et al., 2008). Desta forma, foi possível confirmar a hipótese de que as substâncias polifenólicas presentes na fração acetato de etila a partir do extrato etanólico das folhas de *D. ecastaphyllum*,

apresentam potencial antibacteriano frente a *S. aureus* e *E. faecalis*, e que estes compostos estão relacionados a classe dos flavonóides e especialmente aos taninos tipo condensados.

## 7. CONCLUSÕES

- Dos 22 extratos das 12 espécies vegetais avaliadas na triagem antimicrobiana através do método de difusão em disco, apresentaram atividade os extratos das folhas de *Dodonaea viscosa* e *Cecropia pachystachya*, das folhas e frutos de *Garcinia gardneriana* e das folhas e casca de *Dalbergia ecastaphyllum* frente às bactérias gram positivas *S. aureus* e *E. faecalis* na concentração de 2 mg/disco. Não foi detectada atividade das amostras testadas frente ao fungo *Candida albicans* e às bactérias gram negativas *E. coli* e *P. aeruginosa*.
- O fracionamento com solventes de polaridade crescente do extrato etanólico das folhas de *Dalbergia ecastaphyllum* indicou que a fração acetato de etila apresentou maior halo de inibição frente a *S. aureus* e *E. faecalis* (14 e 12 mm respectivamente), seguida da fração *n*-butanol (8 mm somente para *S. aureus*) no ensaio de difusão em disco.
- No ensaio de macrodiluição a fração acetato de etila apresentou a atividade antibacteriana mais potente, com CBM de 6,25 mg/mL frente a *S. aureus* e 50 mg/mL para *E. faecalis*. A fração *n*-butanol apresentou CBM de 25 mg/mL frente a *S. aureus* e o extrato bruto apresentou CBM de 50 mg/mL para estas duas bactérias.
- A quantificação dos compostos fenólicos mostrou que a fração acetato de etila apresentou o maior teor de compostos fenólicos quando comparado ao extrato bruto e as demais frações.
- Foi observada uma correlação entre o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antibacteriana, pois os compostos fenólicos bioativos ficaram concentrados na fração acetato de etila, justificando a forte atividade detectada frente a *S. aureus* (CBM = 6,25 mg/mL).
- Na análise por CCD foi possível observar que, devido ao comportamento cromatográfico e valores de  $R_f$ , a maioria dos constituintes bioativos presentes na fração acetato de etila correspondem especialmente à classe dos taninos condensados.
- No ensaio bioautográfico a fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *D. ecastaphyllum*, apresentou zonas de inibição, as quais

quando comparadas às análises por CCD estão relacionados aos taninos do tipo condensados.

## REFERÊNCIAS

- ABEYSINGHE, P. D. Antibacterial activity of some medicinal mangroves against antibiotic resistant pathogenic bacteria. **Indian Journal of Pharmaceutical Science**, v.72, p.167-172, 2010.
- ABREU MATOS, F. J.; GOTTLIEB, O. R.; SOUZA ANDRADE, C. H. Flavonoids from *Dalbergia ecastophyllum*. **Phytochemistry**, v.14, n.3, p.825-826, 1975.
- AKERELE, J. O.; OSAHON, O.; EBOMOYI, M. I.; OBOH, I. E.; UWUMARONGIE, O. H. Antimicrobial activity of the ethanol extract and fractions of the seeds of *Garcinia kola* Heckel (Guttiferae). **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.2, p. 169-172, 2008.
- ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v.128, p.1037-1050, 2007.
- ALVES, E. G. A.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo Comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v.31, n.5, p.1224-1229, 2008.
- ANSARI, M. A.; RAZDAN, R. K.; TANDON, M.; VASUDEVAN, P. Larvicidal and repellent actions of *Dalbergia sissoo* Roxb. (F. Leguminosae) oil against mosquitoes. **Bioresource Technology**, v.73, n.3, p. 207-211, 2000.
- AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 90-97, 2008.
- BAHRAMINEJAD, S.; ASENSTORFER, R. E.; RILEY, I. T.; SCHULTZ, C. J. Analysis of the Antimicrobial Activity of Flavonoids and Saponins Isolated from the Shoots of Oats (*Avena sativa* L.) **Journal of Phytopathology**, v.156, p. 1-7, 2008.
- BELDIOUDI, N.; MAMBU, L.; LABAIED, M.; GRELLIER, P.; RAMANITRAHASIMBOLA, D.; RASONAIVO, P.; MARTIN, M. T.; FRAPPIER, F. Flavonoids from *Dalbergia louvelii* and their antiplasmodial activity. **Journal of Natural Products**, v.66, n.11, p.1447-1450, 2003.



BETONI, J. E. C.; MANTOVANI, R. P.; BARBOSA, L. N.; DI STASI, L. C.; FERNANDES JR., A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.4, p.387-390, 2006.

BOTZ, L.; KOCSIS, B.; NAGY, S. **Bioautography** In: WORSFOLD, P.; TOWNSHEND, A.; POOLE, C. Encyclopedia of Analytical Science. 2 ed. Oxford: Elsevier, 2005.

BRIJESH, S.; DASWANI, P. G.; ANTIA, N. H.; BIRDI, T. J. Studies on *Dalbergia sissoo* (Roxb.) leaves: Possible mechanism(s) of action in infections diarrhea. **Indian Journal Pharmacology**, v.38, n.2, p. 120-124, 2006.

BUTLER, M. S.; BUSS, A. D. Natural products — The future scaffolds for novel antibiotics? **Biochemical pharmacology**, v. 71, p. 919-929, 2006.

BYLKA, W.; MATLAWSKA, I.; PILEWSKI, N. A. Natural flavonoids as antimicrobial agents. **Journal of American Medical Association**, v.7, p. 24-31, 2004.

CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v.5, n.11, p. 26-32 2007.

CARVALHO, A. M. A synopsis of the genus *Dalbergia* (Fabaceae: Dalbergiae) in Brazil. **Brittonia**, v. 49, n. 1, p. 87-109, 1997.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: Influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p.1512-1516, 2007.

CAZAROLLI, L. H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E. H.; FIGUEIREDO, M. S. R. B.; FOLADOR, P.; DAMAZIO, R. G.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B. Flavonoids: Prospective Drug Candidates. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.8, p.1429-1440, 2008.

CHATTERJEE, S. K.; BHATTACHARJEE, I.; CHANDRA, G. Isolation and identification of bioactive antibacterial components in leaf extracts of *Vangueria spinosa* (Rubiaceae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.35-40, 2011.

CHATTOPADHYAY, D.; KHAN, M. T. H. Ethnomedicines and ethnomedicinal phytophores against herpesviruses. **Biotechnology Annual Review**, v.14, p.297-348, 2008.

CHIN, Y. M.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v.2, p.239-253, 2006.

CHOI, Y. M.; NOH, D. O.; CHO, S. Y.; SUH, H. J.; KIM, K. M.; KIM, J. M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **LWT-Food Science and Technology**, v. 39, p.756-761, 2006.

CHOMA, I. The use of thin-layer chromatography with direct bioautography for antimicrobial analysis. **LC-GC Europe**, v.18, n. 9, p. 482-488, 2005.

CHOMNAWANG, M. T.; SURASSMO S., NUKOOLKARN, V. S.; GRISANAPAN, W. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p.330-333, 2005.

CHUNG, P. Y.; CHUNG, L. Y., NGEOW, Y. F.; GOH, S. H.; IMIYABIR, Z. Antimicrobial Activities of Malaysian Plant Species. **Pharmaceutical Biology**, v.42, n.4-5, p.292-300, 2004.

CLSI/NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002a. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; - Approved Standard - Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.

CLSI/NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002b. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.

COELHO, G.C.; GNOATTO, S.B.; BASSANI, V.L.; SCHENKEL, E.P. Quantification of saponins in extractive solution of mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Journal of Medicinal Food**, v.13, p. 439-443, 2010.

COLORADO, J. R.; GALEANO, E. J.; MARTÍNEZ, A. M. Desarrollo de La bioautografía directa como método de referencia para evaluar la actividad

antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*. **Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**, v.14, n.1, p.67-71, 2007.

CORREIA, A. F.; SEGOVIA, J. F. O.; GONÇALVES, M. C. A.; DE OLIVEIRA, V. L.; SILVEIRA, D.; CARVALHO, J. C. T.; KANZAKI, L. I. B. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.12, p.369-380, 2008.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v.106, p.290-302, 2006.

COSTA, G. M.; ORTMANN, C. F.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, in press, 2011.

COTA, R. H. S.; GRASSI-KASSISSE, D. M.; SPADARI-BRATFISCH, R. C.; SOUZA BRITO, A. R. M. Anti-ulcerogenic mechanisms of a lyophilized aqueous extract of *Dalbergia monetaria* L. in rats, mice and guinea-pigs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.51, n.6, p.735-740, 1999.

COULIDIATTI, T. H.; MILLOGO-KONÉ, H.; LAMIEN-MÉDA, A.; YOUGBARÉ-ZIÉBROU, M.; MILLOGO-RASOLODIMBY, J.; NACOULMA, O. G.; Antioxidante and antibacterial activities of two *Combretum* Species from Burkina Faso. **Research Journal of Medicinal plant** v.5 p.42-53, 2011.

COWAN, M. M. Plant Products as antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p. 564-582, 1999.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v.60, p. 52-60, 1997.

CRAGG, G. M; NEWMANN, D. J. **Biodiversidade: um componente essencial na descoberta de novos fármacos** In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Química de Produtos Naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Itajaí:UNIVALLI, 2007.

DAS, K.; TIWARI, R.K.S; SHRIVASTAVA, D.K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n.2 p. 104-111, 2010.

DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K.; Brazilian Red Propolis-Chemical Composition and Botanical Origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n.4, p.435-441, 2008.

DE OLIVEIRA, S.Q.; TRENTIN, V.H.; KAPPEL, V.D.; BARELLI, C.; GOSMANN, G.; REGINATTO, F.H. Screening of Antibacterial Activity of South Brazilian *Baccharis* Species. **Pharmaceutical Biology**, v.43, n.5, p. 434-438, 2005.

DEESAMER, S.; KOKPOL, U.; CHAVASIRI, W.; DOUILLARD, S.; PEYROT, V.; VIDAL, N.; COMBES, S.; FINET, J.P. Synthesis and biological evaluation of isoflavone analogues from *Dalbergia oliveri*. **Tetrahedron**, v. 63, p.12986-12993, 2007.

DEMAIN A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**, v.62, p.5-16, 2009.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. São Paulo:UNESP, 2002.

DONNELLY, D.M.X.; KEENAN, P.J.; PRENDERGAST, J.P. Isoflavonoids of *Dalbergia ecastophyllum*. **Phytochemistry**, v.12, n.5, p.1157-1161, 1973.

DUGASANI, S.; BALIJEPALLI, M.; TANDRA, S.; PICHKA, M.; Antimicrobial activity of *Bauhinia tomentosa* and *Bauhinia vahlii* roots. **Pharmacognosy Magazine**, v.6, n.23, p. 204-207, 2010.

FAGUNDES, C.; MADOGGIO, F.A.; SCHENKEL, E.P.; REGINATTO, F.H. Isolamento do flavonóide rutina das folhas de *Musa* sp. In: XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2008, São Paulo. **Resumos**. São Paulo, 2008.

FRANCIS, J.K. **Wildland Shrubs of the United States and its territories: Thamnic descriptions**. U.S. Dept. of Agriculture, Forest Service, International Institute of Tropical Forestry, 2004. Disponível em: <[http://www.fs.fed.us/global/iitf/wildland\\_shrubs.htm](http://www.fs.fed.us/global/iitf/wildland_shrubs.htm)>. Acesso em: dezembro de 2010.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química nova**, v.33, n.3, p.667-679, 2010.

GUNDIDZA, M.; GAZA, N. Antimicrobial activity of *Dalbergia melanoxylon* extracts **Journal of Ethnopharmacology**, v.40, p. 127-130, 1993.

HAJARE, S.W.; CHANDRA, S.; TANDAN, S.K.; SARMA, J.; LAL, J.; TELANG, A.G. Analgesic and antipyretic activities of *Dalbergia sissoo* leaves. **Indian Journal of Pharmacology**, v.32, n.6, p.357-360, 2000.

HARBONE, J. B.; BAXTER, H.; MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants**. 2 ed. London: Taylor & Francis, 1999.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v.5, p. 294-300, 2000.

HAYACIBARA, M.; KOO, H.; ROSALEN, P.L.; DUARTE, S.; FRANCO, E.M.; BOWEN, W.H.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A. In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of Ethnopharmacology**, v.101, n.1-3, p.110-115, 2005.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infections diseases. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.1027-1031, 2002.

HORVÁTH, G.; JÁMBOR, N'; VÉGH, A.; BOSZORMÉNYI, A.; LEMBERKOVICS, É. HÉTHELYI, É.; KOVÁCS, K.; KOCSIS, B. Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC-bioautography. **Flavour Fragrance Journal**, v.25, p. 178-182, 2010.

HOSTETTMANN, K.; GUPTA, M.P.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E.F. **Handbook of strategies for the isolation of bioactive natural products**. Bogota: CYTED, 2008.

HOUGHTON, P.J. use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. **Phytotherapy Research**, v.14, p. 419-423, 2000.

HYE, H.K.M.A.; GAFUR, M.A. Anti inflammatory and antiarthritic activity of a substance isolated from *Dalbergia volubilis*. **Indian Journal of Medical Research**, v.63, n.1, p. 93-100, 1975.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; KANEMATSU, T.; RUANGRUNGSI, N.; HIGASHIHARA, H.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. New Cinnamylphenols from *Dalbergia* Species with Cancer Chemopreventive Activity. **Journal of Natural Products**, v.66, n.12, p. 1574-1577, 2003.

ITOKAWA, H.; MORRIS-NATSCHKE, S.L.; AKIYAMA, T.; LEE, K.H. Plant-derived natural product research aimed at new drug. **Journal of Natural Medicines**, v.62, p. 263-280, 2008.

KAIKABO, A. A., SAMUEL, B. B.; ELOFF, J.N. Isolation and activity of two antibacterial biflavonoids from leaf extracts of *Garcinia livingstonei* (Clusiaceae) **Natural Product Communications**, v.4, n.10, p. 1363-1366, 2009.

KALE, M. MISAR, A.V.; DAVE, V.; JOSHI, M.; MUJUMDAR, A.M. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia lanceolaria* bark ethanol extract in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, n.2, p. 300-304, 2007.

KAPPEL, V.D.; COSTA, G.M.; SCOLA, G.; SILVA, F. A.; LANDELL, M.F.; VALENTE, P.; SOUZA, D.G.; VANZ, D.V.; REGINATTO, F.H.; MOREIRA, J.C.F. Phenolic Content and Antioxidant and Antimicrobial Properties of Fruits of *Capsicum baccatum* L. var. pendulum at Different Maturity Stages. **Journal of Medicinal Food** v.11, n.2, p.267-274, 2008.

KATZ, M. L.; MUELLER, L. V.; POLYAKOV, M.; WEINSTOCK, S. F. Where have all the antibiotic patents gone? **Natural Biotechnology**, v.24, p. 1529–1531, 2006.

KAVIMANI, S.; ILANGO, R.; KRISHNAMOORTHY, G.; TAMIZHMOZHI, M.; JAYKAR, B.; NAGARAJAN, N.S.; MANOJ, C. Antiinflammatory activity of biochanin-A isolated from *Dalbergia sissooides*. **Indian Journal of Heterocyclic Chemistry**, v.6, n.3, p.235-236, 1997.

KAVIMANI, S.; VETRICHELVAN, T.; NAGARAJAN, N.S. Possible mechanism of anti-inflammatory activity of biochanin-A isolated from *Dalbergia sissooides*. **Indian Drugs**, v. 39, n.3, p.161-162, 2002.

KHAN, I.A.; AVERY, M.A.; BURANDT, C.L.; GOINS, D.K.; MIKELL, J.R.; NASH, T.E.; AZADEGAN, A.; WALKER, L.A. Antigiardial activity of isoflavones from *Dalbergia frutescens* bark. **Journal of Natural Products**, v.63, n.10, p. 1414-1416, 2000.

KHURRAM, M.; KHAN, M.A.; HAMEED, A.; ABBAS, N.; QAYUM, A.; INAYAT, H. Antibacterial Activities of *Dodonaea viscosa* using Contact Bioautography Technique. **Molecules**, v.14, p. 1332-1341, 2009.

LANG, K.L.; MORITZ, M.I.G.; HILLMANN, M.C.R. SCHENKEL, E.P. Novas isoflavonas em *D. ecastophyllum*. In: XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2006, Salvador. **Resumos**. Salvador, 2006.

LEE, K. Discovery and Development of Natural Product-Derived Chemotherapeutic Agents Based on a Medicinal Chemistry Approach. **Journal of Natural Products**, v.73, p.500-516, 2010.

LEE, S.H.; KIM, J.Y.; SEO, G.S.; KIM, Y.C.; SOHN, D.H. Isoliquiritigenin from *Dalbergia odorifera*, up regulates anti-inflammatory heme oxygenase-1 expression in RAW 264.7 macrophages. **Inflammation Research**, v. 58, n.5, p.257-262, 2009.

LIMA, E. O. **Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica**. In: YUNES, R.A. e CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, 2001.

LIVERMORE, D. M. Minimising antibiotic resistance. **Lancet Infection Disease**, v. 5, p. 450–459, 2005.

MAHADY, G.B. Medicinal Plants for the Prevention and Treatment of Bacterial Infections. **Current Pharmaceutical Design**, v.11, p. 2405-2427, 2005.

MARINHO, P.R.; MURICY, G.R.S.; SILVA, M.F.L.; DEMARVAL, M.G.; LAPORT, M.S. Antibiotic-resistant bacteria inhibited by extracts and fractions from Brazilian marine sponges. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.2, p.267-275, 2010.

MARZOUK, B.; MARZOUK, Z.; DÉCOR, R.; EDZIRI, H.; HALOUI, E.; FENINA, N.; AOUNI, M. Antibacterial and anticandidal screening of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. from Medenine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.125, n.2, p. 344-349, 2009.

MASIKA, P.J.; SULTANA, N.; AFOLAYAN, A.J. Antibacterial Activity of Two Flavonoids Isolated from *Schotia latifolia*. **Pharmaceutical Biology**, v.42, n.2, p.105-108, 2004.

MASOKO, P.; ELOFF, J.N. The diversity of antifungal compounds of six South African *Terminalia* species (Combretaceae) determined by bioautography. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.12, p.1425-1431, 2005.

MIMICA MATANOVIC, S.; BERGMAN, U.; VUKOVIC, D.; WETTERMARK, B.; VLAHOVIC-PALCEVSKI, V. Impact of restricted amoxicillin/clavulanic acid use on *Escherichia coli* resistance—antibiotic DU90% profiles with bacterial resistance rates: a visual presentation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p. 369-373, 2010.

MISAR, A. V.; KALE, M.; JOSHI, M.; MUJUMDAR, A. M. Analgesic Activity of *Dalbergia lanceolaria*. Bark Extract in Swiss Albino Mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n.8, p. 723-725, 2005.

MUJUMDAR, A.M.; MISAR, A.V.; UPADHYE, A.S. Antidiarrhoeal activity of ethanol extract of the bark of *Dalbergia lanceolaria*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, p. 213-216, 2005.

NARAYANAN, M.C.; RAO, P.R.; SHANMUGAN, N.N.; GOPALAKRISHNAN, S.M.; DEVI, K. Isolation and characterization of bioactive isoflavonoids from the roots of *Dalbergia horrida*. **Natural Product Research**, v. 21, n. 10, p. 903-909, 2007.

NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A.L.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLL, A.R.; SANTOS, P.O.; JÚNI, A.M.B.; TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n.1, p. 108-113, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Source of New Drugs over the Last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70, p.461-477, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Reports**, v.17, p.215-234, 2000.

NEWMAN, D.J. Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? **Journal of Medicinal Chemistry**, v.51, p.2598 – 2599, 2008.

NICOLAOU, K.C.; CHEN, J.S.; DALBY, S. M. From nature to the laboratory and into the clinic. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p. 2290–2303, 2009.

NOSTRO, A.; GERMANOÁ, M.P.; D'ANGELO, V.; MARINO, A.; CANNATELLI, M.A. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v.30, p. 379-384, 2000.

O'DONNELL, G.; GIBBONS, S. Antibacterial Activity of Two Canthin-6-one Alkaloids from *Allium neapolitanum*. **Phytotherapy Research**, v. 21, p.653–657, 2007.



OJIMA, I. Modern natural products chemistry and drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.51, p.2587-2588, 2008.

OKWUTE, S.K.; ONYIA, R.; ANENE, C.; AMODU, O.P. Protectant, insecticidal and antimicrobial potentials of *Dalbergia saxatilis* Hook f. (fabaceae). **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.23, p. 6556-6560, 2009.

ORHAM, D.D.; ÖZÇELİK, B.; ÖZGEN, S. ERGUN, F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiological Research**, v.165, p. 496—504, 2010.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.2, p.301-307, 2008.

PACKER, J. F. LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17 p. 102-107, 2007.

PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products - Can history repeat? **Biochemical Pharmacology**, v.71, p. 981-990, 2006.

PEREIRA, A.C.; OLIVEIRA, D.F.; SILVA, G.H.; FIGUEIREDO, H.C.P.; CAVALHEIRO, A.J.; CARVALHO, D.A.; SOUZA, L.P.; CHALFOUN, S. M. Identification of the antimicrobial substances produced by *Solanum palinacanthum* (Solanaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.80, n.3, p. 427-432, 2008.

PERUMAL SAMY, R.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic Potential of Plants as Anti-microbials for Drug Discovery. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.7, n.3, p. 283-294, 2010.

PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.57-60, 2005.

POTTERAT, O.; HAMBURGER, M. Natural Products in Drug Discovery - Concepts and Approaches for Tracking Bioactivity. **Current Organic Chemistry**, v.10, n.8, p.899-920, 2007.

RAMACHANDRAIAH, P. Antimicrobial activity of *Dalbergia paniculata* seed oil. **Fitoterapia**, v.62, n.3, p.281, 1991.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-613, 2001.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v.23, n. 2-3, p. 127-149, 1988.

ROJAS, J. J.; OCHOA, V. J.; OCAMPO, S. A.; MUÑOZ, J. F. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p.1-6, 2006.

RUNYORO, D.K.B.; MATEE, M.I.N.; NGASSAPA, O.D.; JOSEPH, C.C.; MBWAMBO, Z.H. Screening of Tanzanian medicinal plants for anti-Candida activity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.6, n.11, p.1-10, 2006.

SALEEM, M.; NAZIR, M.; ALI, M.S.; HUSSAIN, H.; LEE, Y.S.; RIAZ, N.; JABBAR, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 238-254, 2010.

SBAC- Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – **Como avaliar e monitorar os resultados de Resistência Bacteriana**, 2010. Disponível em: [http://www.sbac.org.br/pt/conteudos/qualinews/cursos\\_e\\_eventos/sbac\\_rj/jornada\\_rio\\_2010/jornada\\_rio\\_2010\\_04.pdf](http://www.sbac.org.br/pt/conteudos/qualinews/cursos_e_eventos/sbac_rj/jornada_rio_2010/jornada_rio_2010_04.pdf)> Acesso em: fev 2011.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, p.3875-3883, 1991.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A.M.F.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; GIANINNI, M.J.S.M. The use of Standard methodology for determination of antifungal activity of Natural Products against medical yeasts *Candida* sp. and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 391-397, 2007.

SHAI, L.J.; MCGAW, L.J.; ADEROGBA, M.A.; MDEE, L.K.; ELOFF, J.N. Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. Leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 238-244, 2008.

SHAI, L.J.; MCGAW, L.J.; ELOFF, J.N. Extracts of the leaves and twigs of the threatened tree *Curtisia dentata* (Cornaceae) are more active against *Candida*

albicans and other microorganisms than the stem bark extract. **South African Journal of Botany**, v. 75, p.363-366, 2009.

SIBANDA, T.; OLANIRAN, A.O.; OKOH, A.I. In vitro antibacterial activities of crude extracts of *Garcinia kola* seeds against wound sepsis associated *Staphylococcus* strains. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 4, n. 8, p.710-716, 2010.

SIDDIQI, R.; NAZ, S.; AHMAD, S.; SAYEED, S.A. Antimicrobial activity of the polyphenolic fractions derived from *Grewia asiatica*, *Eugenia jambolana* and *Carissa carandás*. **International Journal of Food Science and Technology**, v.46, p.250-256, 2011.

SILVA, B.B.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S.M. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n.3, p.313-316, 2008.

SILVA, F. H. M.; SANTOS, F.A.R. Pollen morphology of the shrub and arboreal flora of mangroves of Northeastern Brazil. **Wetlands Ecology and Management**, v. 17, p. 423-443, 2009.

SILVA, N.C.C.; FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.16, p. 402-413, 2010.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidations substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods enzymology**, n.299, p. 152-178, 1999.

SONGSIANG, U.; WANICH, S.; PITCHUANCHOM, S.; NETSOPA, S.; UANPORN, K.; YENJAI, C. Bioactive constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*. **Fitoterapia**, v.80, n.7, p. 427-431, 2009.

SOUZA BRITO, A.R.M.; COTA, R.H.S.; NUNES, D.S. Gastric antiulcerogenic effects of *Dalbergia monetaria* L. in rats. **Phytotherapy Research**, v.11, n.4, p. 314-316, 1997.

SOUZA, P. Z. **Dinâmica espaço-temporal de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. em restinga no sul do Brasil**. 2010. 118p. (Mestrado em Ecologia) – Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

SOUZA, T. M.; SEVERI, J. A.; SILVA, V. Y. A.; SANTOS, E.; PIETRO, R. C. L. R. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p.221-226, 2007.

TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química nova**, v.31, n.7, p. 1807-1813, 2008.

TAKAHASHI, M.; FUCHINO, H.; SATAKE, M.; AGATSUMA, Y.; SEKITA, S. In vitro screening of leishmanicidal activity in myanmar timber extracts. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n.6, p. 921-925, 2004.

TAO, Y.; WANG, Y. Bioactive sesquiterpenes isolated from the essential oil of *Dalbergia odorifera* T. Chen. **Fitoterapia**, v. 81, n.5, p. 393-396, 2010.

TEFFO, L.S.; ADEROGBA, M.A.; ELOFF, J.N. Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* leaf extracts. **South African Journal of Botany**, v. 76, p.25–29, 2010.

UCHENDU, C.N. Biological activity of root extracts from *Dalbergia saxatilis*. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, v. 6, n.4, p. 91-97, 1999.

UCHENDU, C.N.; KAMALU, T.N.; ASUZU, I.U. A preliminary evaluation of antifertility activity of a triterpenoid glycoside (DSS) from *Dalbergia saxatilis* in female wistar rats. **Pharmaceutical Research**, v.41, n.5, p. 521-525, 2000.

VALGAS, C. **Avaliação de métodos de Triagem para determinação de atividade antibacteriana de Produtos Naturais**. 2002. 103 p. (Mestrado em Farmácia) – Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

VALGAS, C.; SOUZA, S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JR, A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380, 2007.

VASUDEVA, N.; MANISHA, V.; SHARMA, S.K.; SARDANA, S. Chemistry and biological activities of the genus *Dalbergia*. **Pharmacognosy Reviews**, v. 3, p.307-319, 2009.

VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the new millenium: leadfinding and biotechnology. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v.52, p. 253-262, 2000.

WAGNER, H. **Pesquisa Fitomédica no novo milênio: Tendências e mudanças** In: YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Química de Produtos Naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Itajaí: UNIVALLI, 2007.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2 ed. Berlin: Springer, 1996.

WANG, Y. Needs for new plant-derived pharmaceuticals and post-genome era: and industrial view in drug research and development. **Phytochemistry Reviews**, v.7, p.395-406, 2008.

WHO - **World Health Organization - Antimicrobial resistance**. 2002.  
Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>> Acesso em: jun 2010.

ZACHINO, S. **Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos** In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Planta medicinal sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: ARGOS, 2001.

ZUCOLOTO, S.M.; FAGUNDES, C.; REGINATTO, F.H.; RAMOS, F.A.; CASTELLANOS, L.; SCHENKEL, E.P.; DUQUE, C. HPLC-DAD Fingerprinting of flavonoids C-glycosides in different *Passiflora* species. In: VII Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais, 2009, Maringá. **Resumos**. Maringá, 2009.